

# RIBAC

## REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

### SUMÁRIO

<b>Biomarcador da modificação oxidativa da LDL in vivo (Prêmio SBAC)</b> .....	<b>115</b>
<i>N. R. T. Damasceno; E. Apolinário; J. M. A. Oliveira; I. Fernandes &amp; D. S. P. Abdalla</i> Biomarker LDL's oxidative modification in vivo	
<b>Garantia da qualidade do hemograma automatizado (Prêmio PNCQ)</b> .....	<b>121</b>
<i>M. F. R. Ferreira; L. M. F. Vieira &amp; M. Bastos</i> Quality assurance in automated blood count	
<b>A influência da fase pré-analítica no controle de qualidade do diagnóstico colpocitológico (Prêmio CFF)</b> .....	<b>131</b>
<i>Helliana de Araújo Silva; Luiz Mário da Silva Silveira; Pollyana Barbosa Farias Corrêa &amp; Maria da Glória Teixeira de Sousa</i> Pre-analytical phase's influence in the quality control of cervicovaginal smear	
<b>O fragmento 1+2 da protrombina (F 1+2) e a proteína C ativada em pacientes de risco e com doenças coronarianas</b> .....	<b>137</b>
<i>Christiane Vieira Reis; Lauro Mello Vieira; Luci Maria Sant'Anna Dusse; Eduardo Ferraz Coelho; Geralda de Fátima Guerra Lages; Milton Luiz de Freitas; Márcio Ribeiro Diniz; Cyntia do Carmo Costa &amp; Maria das Graças Carvalho</i> Prothrombin fragment 1+2 and activated protein C in patients with risk factors and coronarian diseases	
<b>Doseamento de ácido hipúrico na urina de sapateiros de Porto Alegre e da Grande Porto Alegre</b> .....	<b>143</b>
<i>Simone Bardini; Aletéia S. Alano; Renata Limberger; Ana Lúcia Xavier &amp; Vera M. Steffen</i> Hipuric acid dosing in the urine of the shoemaker from Porto Alegre and the neighborhood	
<b>Otimização da técnica de Citometria de Fluxo para análise do fator tissular em monócitos de sangue periférico</b> .....	<b>145</b>
<i>Lauro Mello Vieira; Luci Maria Sant'Ana Dusse; Olindo Assis Martins Filho &amp; Maria das Graças Carvalho</i> Flow Cytometric assay optimization for peripheral blood monocyte tissue factor analysis	
<b>Caracterização bacteriana em culturas de ponta de cateter no Hospital Geral de Fortaleza</b> .....	<b>151</b>
<i>Everardo Albuquerque Menezes; Cecília Beatriz Fuza Favali; Francisco Afrânio Cunha; Maria Núbia Cavalcante Salviano &amp; Maria Rozelê Ferreira Angelo</i> Catheter tip's bacterial characterization from Fortaleza's General Hospital	
<b>Freqüência de leveduras isoladas em mãos de profissionais de saúde em um hospital público de João Pessoa-PB</b> .....	<b>155</b>
<i>Iolanda Beserra da Costa Santos; Neuza Maria Cavalcante Oliveira; Geofabio S. Casimiro; Danilo Elias Xavier; Isabele B. Santos &amp; Edeltrudes de Oliveira Lima</i> Frequency of yeast isolated from hands of healthcare workers in a public hospital at João Pessoa - Paraíba, Brazil	
<b>Efeito de naringenina e fruta-de-lobo no diabetes</b> .....	<b>161</b>
<i>Tânia Toledo de Oliveira; Selma Coelho Liberato; Tanus Jorge Nagem; Aloisio da Silva Pinto; Neuza Maria de Magalhães; Ednaldo Queiroga de Lima; Neuza Maria Costa Brunoro; Josefina Bressan; Marcelo Rocha da Costa; Rosimar Regina da Silva &amp; Maria Aparecida Leão</i> Naringenin and wolf fruit effects in diabetes	
<b>Ocorrência de <i>Cryptosporidium parvum</i> entre pacientes sidéticos do Centro de Saúde de Porto Alegre, RS</b> .....	<b>167</b>
<i>José R. K. Rodrigues; Sheila B. Lecke; Rafael V. Michel; Tiana Tasca &amp; Geraldo A. De Carli</i> Search <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts in diarrheic feces from AIDS patients in a state medical unit in Porto Alegre, RS	
<b>Citrato urinário na nefrolitíase</b> .....	<b>169</b>
<i>Marlene Leiko Doi Sakuno; Gisele Takahachi; Ana Beatriz Tozzo Martins; Vanderly Janeiro; Regiane Bofetti; Eliane Kiyomi Tabuti &amp; Tatiana Moreno Barbieri</i> Urinary citrate in nephrolithiasis	
<b>Espécies de <i>Trichosporon Behrendi</i>: colonização anal e pedra branca gênito-pública em pacientes HIV+</b> .....	<b>173</b>
<i>Zélia Braz Vieira da Silva Pontes; Edeltrudes de Oliveira Lima; Adriano Lira Ramos; Joana D'Arc Moraes da Silveira Frade &amp; Neuza Maria Cavalcante de Oliveira</i> Species of <i>Trichosporon Behrendi</i> : anal colonization and genito-pubic white piedra in HIV+ patients	

# 3

VOLUME 34

2002

# Biomarcador da modificação oxidativa da LDL *in vivo*\*

## Biomarker LDL's oxidative modification *in vivo*

N. R. T. Damasceno<sup>1,2</sup>; E. Apolinário<sup>3</sup>; J. M. A. Oliveira<sup>2</sup>; I. Fernandes<sup>4</sup> & D. S. P. Abdalla<sup>3</sup>

**RESUMO** – As modificações oxidativas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) são consideradas um fator importante para o desenvolvimento da aterosclerose. Estas modificações ocorrem *in vivo*, originando uma sub-fração denominada de LDL eletronegativa (LDL<sup>-</sup>). O monitoramento clínico da LDL<sup>-</sup> é de extrema importância, mas estava sendo limitado pela dificuldade para a detecção desta partícula em fluidos biológicos. Neste estudo desenvolveu-se novas metodologias para detectar a LDL<sup>-</sup> no plasma, utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-LDL<sup>-</sup> humana (3D1036) e avaliar a resposta imune humoral relacionada à LDL<sup>-</sup>. A LDL<sup>-</sup> plasmática foi analisada através de um ELISA com detecção por quimioluminescência com boa sensibilidade (<1,0 µg/mL) e precisão (CV<sub>intra</sub>=6,44 ± 1,15 % e CV<sub>inter</sub>=8,59 ± 3,42%). As análises dos auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> evidenciaram a presença de uma resposta imune específica para a LDL<sup>-</sup> em humanos e em coelhos. A determinação da LDL<sup>-</sup>, abre novas perspectivas para o monitoramento das modificações oxidativas endógenas da LDL em estudos clínicos e de intervenção que utilizam um elevado número de amostras. Além disto, a detecção dos auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> demonstra o potencial imunogênico desta partícula. Portanto, a detecção da LDL<sup>-</sup> e dos auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> abre novas perspectivas para o monitoramento dos fatores de risco para a aterosclerose vinculados às reações oxidativas.

**PALAVRAS-CHAVE** – LDL<sup>-</sup>, aterosclerose, anticorpo monoclonal, ELISA, auto-anticorpos.

**SUMMARY** – The oxidative modifications of low density lipoprotein (LDL) have been considered as an important risk factor for atherosclerosis development. These LDL modifications occurs *in vivo* generating a subfraction named electro-negative LDL (LDL<sup>-</sup>). Clinical follow up of LDL<sup>-</sup> is extremely important, although it has been limited by difficulties for detection of this particle in biological fluids. The goal of this study was to develop new methodologies to detect LDL<sup>-</sup> in blood plasma using a monoclonal antibody against human LDL<sup>-</sup> and to evaluate the immune humoral response relative to LDL<sup>-</sup>. Determination of plasma LDL<sup>-</sup> was done by a sensitive (<1.0 µg/mL) and precise (CV<sub>intra</sub>=6.44 ± 1.15 % e CV<sub>inter</sub>=8.59 ± 3.42%) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) coupled to chemiluminescence detection. The anti-LDL<sup>-</sup> autoantibodies analysis showed a specific immune humoral response to LDL<sup>-</sup> in humans and rabbits. The specific detection of LDL<sup>-</sup> by ELISA make possible the follow up of the endogenous oxidative modifications of LDL in clinical studies and clinical trials with a high number of samples. Moreover, the detection of autoantibodies against LDL<sup>-</sup> demonstrates the immunogenic potential of this particle. Thus, the detection of LDL<sup>-</sup> particles and autoantibodies against LDL<sup>-</sup> opens new horizons to evaluate risk factors of atherosclerosis related to oxidative reactions.

**KEYWORDS** – LDL<sup>-</sup>, atherosclerosis, monoclonal antibody, ELISA, autoantibodies.

## INTRODUÇÃO

Í números estudos têm demonstrado que as modificações oxidativas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) têm associação com o processo de iniciação e progressão da aterosclerose. A LDL é considerada uma população micro-heterogênea de partículas com características físico-químicas e imunológicas distintas. Avogaro *et al.* (1989) and Cazzolato *et al.* (1991) identificaram uma sub-fração da LDL, denominada de LDL eletronegativa (LDL<sup>-</sup>) devido à sua maior eletro-negatividade em relação à LDL não modificada, ou LDL nativa (LDL-n). A sub-fração LDL<sup>-</sup> apresenta concentrações mais elevadas de óxidos de colesterol e menor concentração de α-tocoferol, quando comparada à LDL-n (Chang *et al.*, 1997). Apesar dos estudos *in vitro* indicarem o envolvimento da LDL<sup>-</sup> na iniciação e

na progressão da aterosclerose (Sevanian *et al.*, 1999), existem dificuldades metodológicas para a determinação desta sub-fração na rotina laboratorial. Anticorpos monoclonais têm sido amplamente utilizados na caracterização das modificações lipídicas e protéicas que ocorrem na LDL durante o processo oxidativo. Neste sentido, vários anticorpos têm sido gerados a partir da indução da oxidação da LDL, *in vitro*, utilizando-se vários agentes oxidantes (Itabe *et al.*, 1996; Hökkö *et al.*, 2000). A detecção da LDL oxidada (Palinski *et al.*, 1990; Esterbauer *et al.*, 1992; Virella *et al.*, 1993) e de auto-anticorpos anti-lipoproteínas oxidadas nas lesões ateroscleróticas (Prat *et al.*, 1993, Yla-Hertuala *et al.*, 1994) têm confirmado a presença de lipoproteínas oxidadas *in vivo* e a participação do sistema imunológico no processo da aterosclerose. Sabe-se que monócitos/macrófagos, na presença de lipoproteínas modificadas

Recebido em 9/7/2002

Aprovado em 11/7/2002

Prêmio SBAC - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

\*Laboratório de Bioquímica Clínica (FCF-USP);

<sup>1</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil;

<sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil;

<sup>4</sup>Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

oxidativamente, aumentam a expressão de receptores *scavenger* (Brown *et al.*, 1980) e/ou receptores para a fração Fc das imunoglobulinas (Stanton *et al.*, 1992). Este evento permitiria a captação de partículas ricas em ésteres de colesterol, através de um processo não controlado por *feed-back* negativo, dando origem às células espumosas (*foam cells*).

Considerando as modificações oxidativas da LDL que ocorrem durante o processo aterosclerótico e a detecção de autoanticorpos anti-LDL oxidada na circulação e nas lesões ateroscleróticas, poder-se-ia inferir que a LDL após ser oxidada torna-se um auto-antígeno, desencadeando uma resposta auto-imune. O objetivo deste estudo foi estabelecer um ELISA com sensibilidade e especificidade adequadas para detectar a sub-fração LDL<sup>-</sup> no plasma humano e avaliar a resposta de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> no plasma. A utilização destes ensaios possibilitará o monitoramento da formação da LDL<sup>-</sup> no acompanhamento clínico-laboratorial de indivíduos em condições de risco para o desenvolvimento da aterosclerose.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de LDL e purificação da sub-fração LDL<sup>-</sup>

Amostras de sangue obtidas a partir de doadores voluntários saudáveis foram coletadas em tubos contendo etilenodiamino tetracético (EDTA, 1,0 mg/mL de sangue). O plasma foi separado por centrifugação a 1500 g por 10 min, a 4°C, e 1,0 mmol/L de fenilmetilsulfonil fluoreto, 2,0 mmol/L de benzamida, 2,0 mg/mL de aprotinina e 20,0 mmol/L de hidroxitolueno butilado foram adicionados para prevenir a atividade das proteases e as reações oxidativas. A lipoproteína de baixa densidade (1,019 <d<1,063 g/mL) foi isolada por ultracentrifugação preparativa, utilizando-se uma ultracentrífuga Sorvall (Sorvall Ultra Pro80, Sorvall Products, Newtown, CT, USA) equipada com rotor vertical (T-1270) durante 5 hs, a 18.000 x g, à 4°C. Após a separação, a LDL foi dialisada contra 150,0 mmol/L de cloreto de sódio, 1,0 mmol/L de EDTA, 10,0 mmol/L de Trizma base e 3,0 mmol/L de azida sódica, à 4°C por 12 hs. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical, St. Louis, MO. A purificação de LDL<sup>-</sup> foi realizada segundo Cazzolato *et al.* (1991). A LDL<sup>-</sup> foi isolada através de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se uma coluna de troca iônica UNO Q-1 de 7,0 mm x 35,0 mm (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) e monitoramento em 280 nm (detector de fotodiodos SPD-M10A Shimadzu, Tokyo, Japan). Injetou-se 1,0 mL da fração LDL total (1,0 mg de proteínas/mL) na coluna e iniciou-se a corrida cromatográfica com uma fase móvel constituída por tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2, a um fluxo de 1,0 mL/min. Após 5 minutos de corrida, um gradiente formado por NaCl (0 a 0,3M) em tampão Tris-HCl foi utilizado para eluição durante 45 min. Os picos, correspondentes à LDL nativa e LDL<sup>-</sup> foram coletados em tubos imersos em banho de gelo, contendo 1,0 mg/mL de EDTA, 1,0 mmol/L de fenilmetilsulfonil fluoreto, 2,0 mmol/L de benzamida, 2,0 mg/mL de aprotinina and 20,0 mmol/L de hidroxitolueno butilado. As amostras foram concentradas em Speed-Vac SC 110 (Savant Instruments Inc. Holbrook, NY, US) e os sais removidos através de colunas Econo-Pac 10DG (cat. n° 7322010, Bio-Rad Inc.,

Hercules, CA). As possíveis contaminações com imunoglobulinas e albumina foram eliminadas, respectivamente, através da aplicação da sub-fração LDL<sup>-</sup> às colunas Econo-Pac (cat. n° 7322027, Bio-Rad Inc., Hercules, CA) e HiTrap Blue (cat. n° 17-0412-01, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A concentração de proteínas foi determinada através do método de Lowry *et al.* (1951). A LDL<sup>-</sup>, obtida conforme descrito acima, foi utilizada como controle positivo no ELISA e como antígeno na determinação de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup>.

### Caracterização do anticorpo monoclonal anti-LDL<sup>-</sup>

O protocolo de produção e caracterização do anticorpo monoclonal anti-LDL<sup>-</sup> (3D1036) baseou-se nos estudos prévios realizados por Damasceno (2001). Avaliou-se o anticorpo em relação ao seu índice de reatividade com a LDL nativa e a LDL<sup>-</sup> em humanos e em coelhos e determinou-se o isotipo e o título.

### Especificidade do anticorpo monoclonal anti-LDL<sup>-</sup> (Imunoblot)

A reatividade do anticorpo monoclonal contra a sub-fração LDL<sup>-</sup> foi avaliada por Imunoblot. Aliquotas de LDL<sup>-</sup> (2,0 µg/mL) e LDL nativa (1,0 µg/mL) foram aplicadas em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, e transferidas para membranas de nitrocelulose por 2 hs (Whatman®, cat. 3001917, Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra) usando-se um sistema de transferência (Multiphor II°, cat. 18101685, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A eficiência da transferência foi monitorada com o corante Ponceau S (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Através da transferência simultânea de padrões de alto peso molecular, determinou-se também o peso molecular da sub-fração da LDL<sup>-</sup> reconhecida pelo anticorpo. Neste processo, as membranas de nitrocelulose foram tratadas com tampão Tris-salina 0,5 M (TBS) pH 7,5 contendo 5% de leite desnatado (Molico®, Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) por 2 hs à temperatura ambiente e sob agitação constante (10 ciclos/min). Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS (5 min/lavagem) e incubadas com o anticorpo anti-LDL<sup>-</sup> (1:1000) por 2 hs à temperatura ambiente e sob agitação constante (10 ciclos/min). Em seguida, as membranas foram lavadas, conforme descrito acima, e incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Rockland Immunochemicals for Research, Gilbertsville, PA, USA) diluído 1:500 (v/v) em TBS contendo 1% de leite desnatado. As membranas foram incubadas por 2 hs à temperatura ambiente. Após a lavagem, a reação foi monitorada pela adição de 4α-naftol (Sigma Chemical, St. Louis, MO) em metanol, TBS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (3,0 mL/17,0 mL/20,0 µL, respectivamente).

### Detecção de LDL<sup>-</sup> no plasma (ELISA)

Para a padronização do ELISA utilizou-se amostras de plasma humano provenientes de indivíduos hipercolesterolêmicos e com aterosclerose suplementados com α-tocoferol (400 UI/dia de acetato de D-α-tocoferol) (n=15, 198,73 ± 55,23 mg de colesterol/mL) e hipercolesterolêmicos não suplementados (n=15, 197,43 ± 22,42 mg de colesterol/mL); e de coelhos normolipidêmicos (n=5, recém-desmamados e alimentados com

dieta formulada isenta de colesterol (T=0) e coelhos hipercolesterolêmicos (n=5, recém-desmamados e alimentados com dieta formulada isenta de colesterol, contendo 27% de caseína (T=180 dias de dieta). O sangue foi coletado em EDTA (1,0 mg/ml) e o plasma imediatamente separado em tubos contendo BHT (20,0 mM), aprotinina (2,0 µg/ml), benzamidina (2,0 mM) e PMSF (1,0 mM) e estocado a -70°C, até o momento das análises. As amostras foram diluídas (1:2) com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,4 e incubadas (50 µL/poço) em placas de ELISA de 96 poços (EIA/RIA, Costar, Cambridge, MA, USA), por 12hs, a 37°C. Após este período, o material não adsorvido foi descartado, sendo os sítios livres bloqueados com PBS-leite desnatado 5%. As placas foram incubadas por 2 hs a 37°C e lavadas 5 vezes com PBS-Tween. Em seguida, as placas foram incubadas com o anti-LDL<sup>-</sup> MAb (1:5000 v/v; 50 µL/poço) por 2 hs à 37°C. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS e o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Rockland Immunochemicals for Research, Gilbertsville, PA, USA) diluído 1:1000 (v/v) em PBS-leite desnatado (1%) foi adicionado, incubando-se por 2 hs à 37°C. O substrato (50 µL de 2,3M isoluminol + 0,9M 4-iodophenol diluído em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8.5 e 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,6%) foi adicionado a cada poço, sendo a luz emitida monitorada durante 10 minutos (início da emissão até o decaimento da emissão), utilizando-se uma leitora para placas LumiCount (Spectra Count, Canberra Company, Meriden, CT). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em µg de LDL<sup>-</sup>/mL, tendo a curva padrão sido calibrada com LDL<sup>-</sup> (1 a 2900ng/mL). Como controles positivos e negativos, usou-se LDL<sup>-</sup> e LDL nativa, respectivamente.

#### Detecção de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> no plasma (ELISA)

Amostras de LDL<sup>-</sup> e LDL nativa, obtidas conforme previamente descrito acima, foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,4) até a concentração final de 1,0 µg/poço. Após o preparo das amostras, placas de 96 poços (EIA/RIA, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas e incubadas por 12 hs, à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sendo os sítios livres bloqueados com leite a 5% diluído em tampão fosfato (PBS), pH 7,4 cujas proteases haviam sido previamente inativadas pelo calor. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween (0,05%). Após esta etapa, amostras de plasma dos indivíduos hipercolesterolêmicos e de coelhos normo e hipercolesterolêmicos, foram diluídas em leite 1%-PBS (1:10, 1:20, 1:40, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120). Adicionou-se 50,0 µl de cada amostra/poço e incubou-se as placas por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas, conforme descrito acima. Posteriormente adicionou-se (50,0 µl/poço) do anticorpo anti-IgG humano e de coelho marcados com peroxidase (1:1000 e 1:2000, respectivamente), diluído em leite 1%-PBS, sendo as placas incubadas por 1 h e 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas, adicionado-se a solução de substrato contendo 0,53 mg de ABTS/mL de tampão citrato-fosfato 1,0 M + 0,25µL

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(a 30%)/mL. As placas foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, sendo a absorbância monitorada a 405 nm. A partir das absorbâncias monitoradas determinou-se a absorbância específica (Absorbância x título do ensaio anti-LDL<sup>-</sup> menos a absorbância x título do ensaio anti-LDL nativa). Os resultados foram apresentados em relação ao equivalente de IgG anti-LDL<sup>-</sup> (absorbância aplicada à equação da curva padrão). A curva padrão foi feita com IgG total purificada de humanos e coelhos normais (1 a 2900 ng/mL).

#### Detecção de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> na aorta (ELISA)

Baseando-se nas técnicas previamente descritas por Yla-Hertuala *et al.*, (1988) e Owens *et al.* (1997), com algumas modificações, a IgG da aorta de coelhos com aterosclerose foi extraída e purificada. A IgG obtida deste modo foi utilizada na padronização do ELISA para detecção de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> na aorta. O esquema abaixo demonstra as etapas de extração e purificação da IgG (Fig. 1). A partir da extração da IgG da aorta de coelhos, realizou-se a padronização do ELISA para a detecção de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> presentes na aorta destes animais. Inicialmente realizou-se a titulação (1:1 a 1:80 em série) das amostras para a determinação do título adequado à reação. Os resultados de

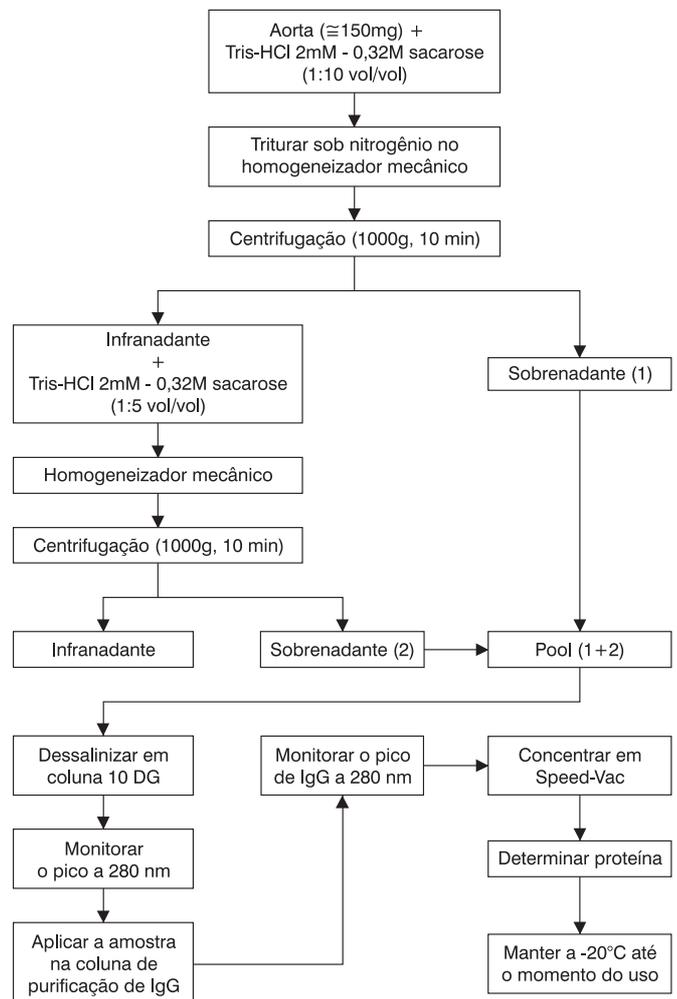


FIG. 1 - Esquema de extração e purificação de IgG da aorta de coelhos.

monstraram que as amostras não poderiam ser diluídas durante o imunoenensaio. O protocolo do ELISA para a detecção de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> na aorta foi o mesmo aplicado à detecção de auto-anticorpos no plasma, exceto que os resultados foram expressos em unidades relativa de luz (URL). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico SPSS (versão 9.0 para Widows/1999) desenvolvido pela SPSS Corporation. Utilizou-se ANOVA para a análise de variância e as diferenças foram determinadas através do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão.

## RESULTADOS

### Purificação da LDL<sup>-</sup>

A separação da sub-fração da LDL através de cromatografia líquida de troca iônica é apresentada na Fig. 2. O pico 1 corresponde à LDL nativa (LDL-n), enquanto o pico 2 contém a sub-fração da LDL mais eletronegativa (LDL<sup>-</sup>).

### Purificação e isotipagem do anticorpo anti-LDL<sup>-</sup>

Os resultados de isotipagem do anticorpo anti-LDL<sup>-</sup> após a purificação demonstraram que a imunoglobulina gerada é do tipo IgG2b (Fig. 3). A reatividade específica para uma só imunoglobulina evi-

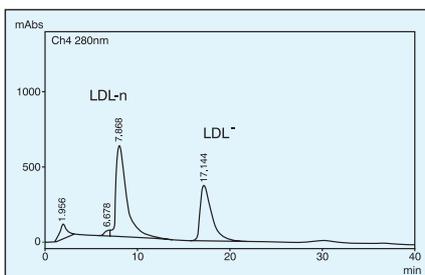


FIG. 2 - Cromatograma de purificação da LDL nativa (LDL-n) e da LDL eletronegativa (LDL<sup>-</sup>).

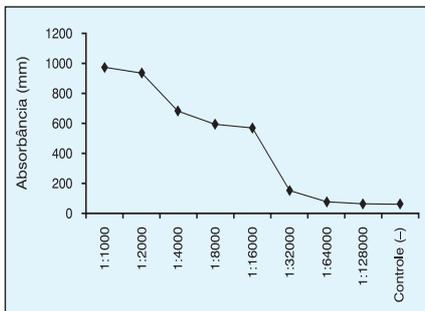


FIG. 3 - Isotipagem do sobrenadante de cultura e do líquido ascítico após a purificação. O *cut off* foi considerado como o dobro da absorvância detectada no controle negativo (meio de cultura e líquido ascítico sem Igs anti-LDL<sup>-</sup>). Os resultados são apresentados como média obtida a partir das análises conduzidas em triplicata.

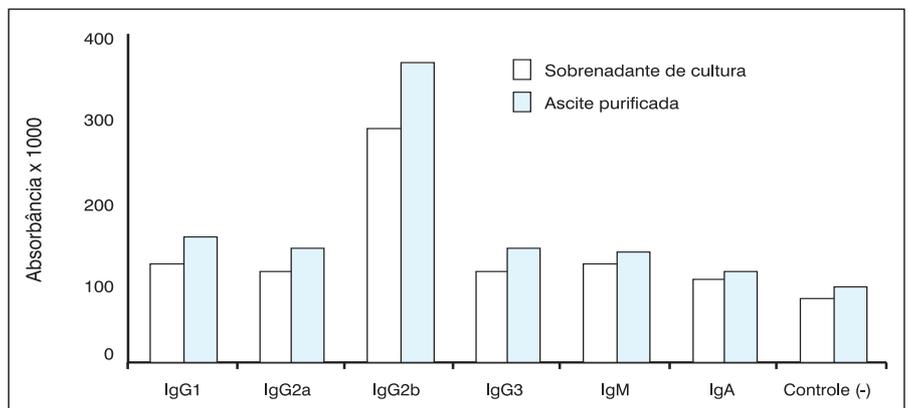


FIG. 4 - Titulação do anticorpo monoclonal anti-LDL<sup>-</sup> purificado a partir do líquido ascítico e titulado no ELISA contra a LDL<sup>-</sup> purificada por cromatografia líquida de alto desempenho com coluna de troca iônica. Os valores são apresentados como média de triplicatas. O *cut off* foi considerado como o dobro da absorvância detectada no controle negativo.

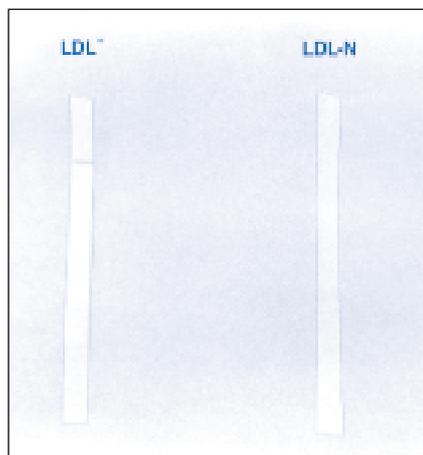


FIG. 5 - Imunoblot obtido com o anticorpo monoclonal anti-LDL<sup>-</sup>. Utilizou-se a sub-fração de LDL<sup>-</sup>, purificada como descrito em Material e Métodos; a fração de LDL nativa foi utilizada como controle negativo da reação.

### Imunoblot

Os resultados obtidos indicaram que o anticorpo anti-LDL<sup>-</sup> reconhece somente um determinante antigênico expresso apenas na LDL<sup>-</sup>, não reconhecendo a LDL nativa (Fig. 5). A eletroforese da sub-fração da LDL<sup>-</sup> mostrou três bandas protéicas, sendo que o anticorpo monoclonal reconheceu um epítipo na banda correspondente a 324.000 kDa visualizada em SDS-PAGE (Fig. 6). Portanto, os resultados mostram que o anticorpo anti-LDL<sup>-</sup> reconhece um epítipo expresso nas estruturas tridimensional e linear da LDL<sup>-</sup>, como verificado no ELISA e no Imunoblot.

### Detecção de LDL<sup>-</sup> no plasma

A LDL<sup>-</sup> foi detectada no plasma de indivíduos hipercolesterolêmicos suplementados ou não com  $\alpha$ -tocoferol. Entretanto, não se verificou nenhum efeito da suplementação de  $\alpha$ -tocoferol sobre a concentração de LDL<sup>-</sup> (Fig. 7A). As análises de LDL<sup>-</sup> no plasma de coe-

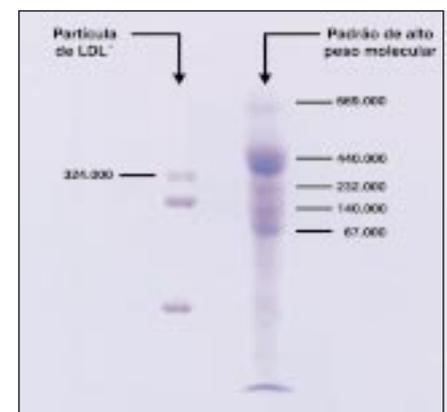
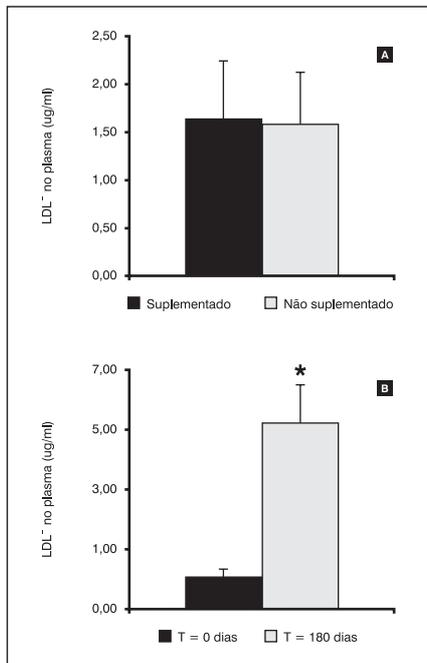


FIG. 6 - Identificação do peso molecular (PM) da apoB da sub-fração da LDL, reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-LDL<sup>-</sup>. A determinação do PM baseou-se na comparação do peso molecular da sub-fração da LDL<sup>-</sup> reconhecido pelo anticorpo com padrões primários de alto peso molecular e cálculo do Rf.



**FIG. 7 -** Determinação da concentração de LDL<sup>-</sup> no plasma de indivíduos hipercolesterolêmicos (n=15) e normolipidêmicos (n=15) e de coelhos normolipidêmicos (n=5) e hipercolesterolêmicos (n=15). Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão. A diferenças foram determinadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

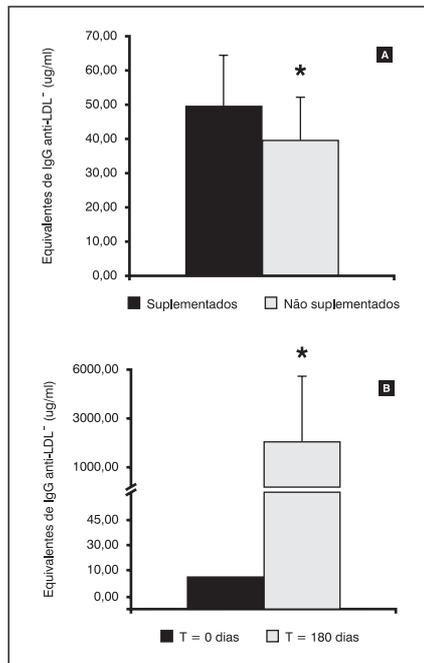
lhos indicaram um aumento significativo desta sub-fração na circulação sistêmica após 180 dias de administração da dieta hipercolesterolêmica (Fig. 7B). O ELISA apresentou sensibilidade para detectar <math><1,0 \mu\text{g}</math> de proteína/mL de LDL<sup>-</sup> e precisão adequada, sendo o coeficiente de variação intra-ensaio igual a

#### Detecção de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> no plasma

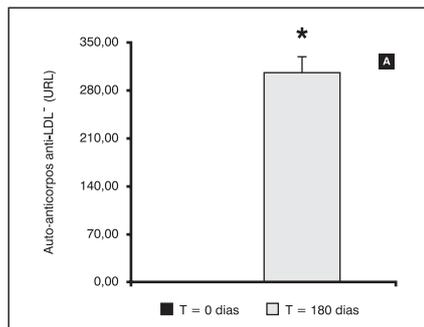
Auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> foram detectados no plasma dos indivíduos hipercolesterolêmicos e dos coelhos alimentados com a dieta aterogênica. No grupo de pacientes suplementados com  $\alpha$ -tocoferol detectou-se níveis mais elevados de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup>, quando comparados aos não suplementados (Fig. 8A). O aumento na concentração de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> no plasma de coelhos foi significativo ao longo do período de indução de hipercolesterolemia (Fig. 8B).

#### Detecção de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> na aorta

A IgG extraída da aorta dos coelhos foi reativa para a LDL<sup>-</sup>, como demonstrado através de ELISA, indicando a presença de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> no segmento da aorta contendo lesões ateroescleróticas. Quando a análise foi realizada no tecido aórtico sem lesões ateroescleróticas, não se constatou reatividade das imunoglobulinas extraídas contra a LDL<sup>-</sup> (Fig. 9).



**Fig. 8 -** Determinação do auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> no plasma humano e de coelhos. Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão. As diferenças foram determinadas pelo teste de Tukey (p<0,05).



**FIG. 9 -** Determinação da concentração de auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> na aorta de coelhos (n=5). Os valores referentes ao T= 0 não foram apresentados, pois os resultados obtidos estiveram dentro do ponto de corte (*cut off*=2x *background*). Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão. As diferenças foram determinadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

limitado às investigações experimentais. Mais recentemente, as evidências da participação do sistema imune na aterosclerose têm contribuído para o desenvolvimento de diversos ensaios imunológicos voltados à determinação indireta de produtos de oxidação lipoprotéica (Ylä-Hertuala *et al.*, 1994; Prat *et al.*, 1993). Neste sentido, a determinação da presença de auto-anticorpos, reativos à LDL modificada *in vitro* por MDA (van Haelst *et al.*, 2002), Cu<sup>2+</sup> (Bakalova *et al.*, 1999) e peroxinitrito- (Seccia *et al.*, 1997), na circulação e nos tecidos reforçam a participação do sistema imunológico na progressão da aterosclerose. Associados aos imunoenaios para determinação de auto-anticorpos anti-lipoproteínas oxidadas, diversos anticorpos poli e monoclonais foram produzidos na tentativa de avaliar de modo direto a presença destas partículas na circulação e em tecidos (Hörkkö *et al.*, 2000; Palinski *et al.*,

## DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram demonstrar a presença da LDL<sup>-</sup> no plasma, através de um ensaio ELISA com elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade e sua associação com a resposta imune humoral anti-LDL. Atualmente, o monitoramento laboratorial do risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose no diabetes mellitus (Fullet *et al.*, 1980), na hipertensão (Kannel, 1975), e nas dislipidemias (Castelli, 1992) é realizado basicamente através da determinação do perfil lipídico (Consensus of NIH, 1994) Mesmo considerando-se a grande variedade de fatores relacionados com o processo ateroesclerótico, a determinação da concentração do LDL-colesterol ainda representa o principal índice utilizado na avaliação de risco da aterosclerose (Passarassi *et al.*, 2001). Entretanto, o valor preditivo determinado a partir da LDL, ou da análise de outras lipoproteínas, é limitado devido à grande variedade de fatores relacionados à progressão da aterosclerose. As modificações oxidativas da LDL vêm sendo consideradas como um elemento adicional independente e diretamente vinculado ao desenvolvimento da aterosclerose (Stehbens, 1999; Griffin, 1999; Regström *et al.*, 1992). No entanto, o monitoramento laboratorial da LDL oxidada ainda apresenta diversas limitações. Dentre as técnicas disponíveis, a cromatografia líquida de alto desempenho tem sido utilizada, mas apresenta várias desvantagens, tais como, o elevado custo do equipamento, os procedimentos demorados e com diversas etapas para o preparo e análise das amostras e o reduzido número de equipamentos disponíveis, o que tornam tal procedimento

1996; Itabe *et al.*, 1996). Embora seja crescente a utilização destes anticorpos, a maioria dos "antígenos" utilizados durante o processo de produção dos anticorpos baseia-se na geração de epítopos a partir da oxidação da LDL *in vitro*, utilizando agentes oxidantes fortes ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ONOO}^-$ ), os quais promovem alterações drásticas nestas partículas, que não refletem as condições fisiológicas associadas à formação da LDL oxidada *in vivo*. Para avaliar as modificações endógenas da LDL, o anticorpo monoclonal (3D1036) anti-LDL<sup>-</sup>, utilizado neste estudo, foi gerado a partir de uma sub-fração da LDL oxidada *in vivo* (LDL<sup>-</sup>), como previamente descrito por Damasceno (2001). A utilização do anticorpo monoclonal (3D1036) no ELISA resultou em um ensaio adequado para a determinação da LDL<sup>-</sup> no plasma de humanos e de coelhos. Este ELISA apresentou uma alta sensibilidade ( $< 1 \mu\text{g/mL}$ ), permitindo a detecção da LDL<sup>-</sup> no plasma de indivíduos normo e hiperlipidêmicos, boa precisão ( $\text{CV}_{\text{intra}} = 6,44 \pm 1,15\%$  e  $\text{CV}_{\text{inter}} = 8,59 \pm 3,42\%$ ) e baixa reatividade cruzada com a LDL nativa ( $< 1\%$ ). Além disto, este ensaio apresenta outras vantagens, tais como:

(i) a possibilidade de automação, o que permitirá a realização simultânea de grande número de análises;

(ii) representar o único ensaio, atualmente disponível, para a avaliação direta e quantitativa de LDL<sup>-</sup> e

(iii) poder ser utilizado para análises de rotina nos laboratórios clínicos.

As análises da concentração de LDL<sup>-</sup> no plasma humano demonstraram que a suplementação de  $\alpha$ -tocoferol não promoveu variação significativa na geração desta partícula. Este efeito negativo do  $\alpha$ -tocoferol pode estar associado aos seguintes fatores:

(i) às diferenças individuais na concentração plasmática basal de  $\alpha$ -tocoferol;

(ii) à dose de  $\alpha$ -tocoferol (400 UI/dia de acetato de D- $\alpha$ -tocoferol) e

(iii) ao fato dos indivíduos estudados já serem portadores de aterosclerose comprovada angiograficamente. No modelo experimental de aterosclerose, as concentrações de LDL<sup>-</sup> no plasma de coelhos relacionaram-se diretamente com o desenvolvimento da hipercolesterolemia induzida pela dieta. As análises dos auto-anticorpos anti-LDL<sup>-</sup> no plasma humano indicaram um aumento significativo deste parâmetro após a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol. O  $\alpha$ -tocoferol, além de sua ação antioxidante, atua como um modulador da resposta imune (Oliveira *et al.*, 2000; Meydane *et al.* 1996). Os resultados apresentados neste estudo corroboram esta afirmação, pois enquanto o  $\alpha$ -tocoferol não foi capaz de reduzir as modificações oxidativas da LDL e, conseqüente, a geração de LDL<sup>-</sup>, estimulou a resposta imune humoral específica para a LDL<sup>-</sup>. Entretanto, se este estímulo contribuir para a formação de imunocomplexos, gerados a partir da interação covalente do antígeno livre (LDL<sup>-</sup>) com os seus auto-anticorpos (Festa *et al.*, 1998; Nezlín *et al.*, 2000), este evento poderia ser um fator pró-aterogênico adicional, devido a uma possível captação destes imunocomplexos via receptor Fc das imunoglobulinas, presentes nos macrófagos. De acordo com os resultados apresentados neste estudo, a avaliação indireta da presença de LDL<sup>-</sup> no plasma de coelhos, através da determinação de auto-anticorpos, mostra uma correlação com os métodos que quantificam diretamente a LDL<sup>-</sup>. Entretanto, esta correlação não foi observada no plasma humano. Este fato, torna limitada a sua aplicação clínica isolada. Portanto, a utilização do ELISA para determinação direta da concentração de LDL<sup>-</sup>

no plasma cria novas perspectivas para o monitoramento clínico-laboratorial das reações oxidativas da LDL ocorridas *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- Avogaro, P.; Bittolo-Bon, G.; Cazzolato, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Atherosclerosis*. 8, 79-87, 1989.
- Bakalova, R.; Zhelev, Z.; Goudev, A.; Ribarov, S.; Nachev, C. Serum level of IgG autoantibodies against oxidized low density lipoproteins and heart disease - inverse correlation. *Gen Physiol Biophys*. 18(1), 87-97.
- Brown, M. S.; Basu, S. K.; Falck, J. R.; Ho, Y. K.; Goldstein, J. L. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J. Supram.* 13, 67-81, 1980.
- Castelli, W. P. Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am. J. Cardiol.* 70, 3H-9H, 1992.
- Cazzolato, G.; Avogaro, P.; Bittolo-Bom, G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Rad. Biol. Med.* 11, 247-253, 1991.
- Chang, Y. H.; Abdalla, D. S. P.; Sevanian, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative, oxidation of low density lipoprotein. *Free Rad. Biol. Med.* 2, 202-214, 1997.
- Conference of Consense of NIH- Tryglicerides. HDL-cholesterol and coronary disease. *Suplemento Jama*. 6, 1616-1624, 1994.
- Damasceno, N. R. T. *Influência da isoflavonas extraídas da soja na hipercolesterolemia e na aterosclerose experimental induzida pela caseína*. FCF-USP. Tese de Doutorado. São Paulo, 2001.
- Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jurgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13(4), 341-390, 1992.
- Festa, A.; Kopp, H. P.; Scherthaner, G.; Menzel, E. J. Autoantibodies to oxidized low density lipoproteins in IDDM are inversely related to metabolic control and microvascular complications. *Diabetologia*. 41, 350-356, 1998.
- Fuller, J. N.; Shipler, M. J.; Rose, G.; Jarret, R. J.; Keen, N. Coronary heart disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitcath study. *Lancet*. 32, 1373-1379, 1980.
- Horkko, S.; Binder, C. J.; Shaw, P. X.; Chang, M.; Silverman, G.; Palinski, W.; Witztum, J. L. Immunological response to oxidized LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 28(12), 1771-1779, 2000.
- Hubert, H. B.; Feinleib, M.; McNamara, P. M.; Castelli, W. P. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study. *Circulation*. 67(5), 968-977, 1983.
- Itabe, H.; Yamamoto, H.; Imanaka, T.; Shimamura, K.; Uchiyama, H.; Kimura, J.; Sanaka, T.; Hata, Y.; Takano, T. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using monoclonal antibody. *J. Lipid. Res.* 37, 45-53, 1996.
- Kannel, W. B. Role of blood pressure in cardiovascular disease. The Framingham study. *Angiology*. 26, 1-14, 1975.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 32, 265-275, 1951.
- Meydani, S. M.; Meydani, M.; Blumberg, J. B. Vitamin E supplementation and *in vivo* immune response in healthy elderly subjects; *J Am Med Assoc*; 227, 1380-1386, 1997.
- Nezlín, R. A quantitative approach to the determination of antigen in immune complexes. *J. Immunol.* 237, 1-17, 2000.
- Oliveira, F. G.; Rossi, C. L.; Oliveira, M. G.; Saad, M. J. A.; Velloso, L. A. Effect of vitamin E supplementation on antibody levels against malondialdehyde modified LDL in hyperlipidemic hamsters. *Cardiovasc. Res.* 47, 567-573, 2000.
- Owens, G. P.; Burgoon, M. P.; Devlin, M. E.; Gildeen, D. H. Extraction and purification of active IgG from SPEE and MS brain. *J. Virol. Methods*. 68, 119-125, 1997.
- Palinski, W.; Miller, E.; Witztum, J. L. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *PNAS*. 92, 821-825, 1996.
- Palinski, W.; Yla-Herttuala, S.; Rosenfeld, M. E.; Butler, S. W.; Socher, S. A.; Parthasarathy, S.; Curtiss, L. K.; Witztum, J. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*. 10, 325-335, 1990.
- Parasassi, T.; Bittolo-Bon, G.; Brunelle, R.; Cazzolato, G.; Krasnowska, K.; Mei, G.; Sevanian, A.; Ursini, F. Loss of Apo-B secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL<sup>-</sup>. *Free Rad. Biol. Med.* 31(1); 82-89, 2001.
- Prat, L.; Torres, G.; Carrió, I.; Roca, M.; Riambau, V.; Berná, L.; Estorch, M.; Ferrer, I.; Garcia, C. Polyclonal In-IgG, 125I-LDL and 125I-endothelin-1 accumulation in experimental arterial wall injury. *Eur. J. Nucl. Med.* 20, 1141-1145, 1993.
- Regstrom, J.; Torvall, P.; Nilsson, J.; Landou, C.; Hamsten, A. Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*. 339, 1183-1186, 1992.
- Seccia, M.; Derugini, C.; Bellomo, G. The formation of some antigenic epitopes in oxidized human low-density lipoprotein is inhibited by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232(3), 613-617, 1997.
- Sevanian, A.; Asatryan, L.; Ziouzenkova, O. Low density lipoprotein (LDL) modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis. *Blood Purification*. 17, 66-78, 1999.
- Stanton, L. W.; White, R. T.; Bryant, C. M.; Protter, A. A.; Enderman, G. A macrophage Fc receptor for IgG is also a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 267(31), 22446-22451, 1992.
- Stehbens, W. E. The oxidative stress hypothesis of atherosclerosis: cause or product? *Med. Hypotheses*. 53(6); 507-515, 1999.
- Van Haelst, P. L.; Asselbergs, F. W.; Van Doormaal, J. J.; Tervaert, J. W. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with premature atherosclerosis: prevalence and association with risk factors. *J. Intern. Med.* 251(1), 29-34, 2002.
- Virella, G.; Virella, I.; Leman, R. B.; Pryor, M. B.; Lopes-virella, M. F. Anti-oxidized low density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 23, 95-101, 1993.
- Yla-Herttuala, S.; Jaakkola, O.; Ehnholm, C.; Tikkanen, M. J.; Solakivi, T.; Sarkioja, T.; Nikkari, T. Characterization of two lipoproteins containing apolipoprotein B and E from lesion-free human aortic intima. *J. Lipid. Res.* 29, 563-572, 1988.
- Yla-Herttuala, S.; Palinski, W.; Butler, S. W.; Picard, S.; Steinberg, D.; Witztum, J. L. Rabbit and human atherosclerotic lesion contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arteriosclerosis Thromb.* 14, 32-40, 1994.

Endereço para correspondência

Dulcineia Saes Parra Abdalla

Fac. de Ciências Farm. - Univ. de S. Paulo - Depto. de Anál. Clín. e Toxic.

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - 05508-900 São Paulo, SP, Brasil

Telefone: (0xx11)3091-3637/3741 - Fax: (0xx11)3813-2197

E-mail: dspa@usp.br

# Garantia da qualidade do hemograma automatizado\*

## Quality assurance in automated blood count

M. F. R. Ferreira<sup>1</sup>; L. M. F. Vieira<sup>2</sup> & M. Bastos<sup>3</sup>

**RESUMO** – O Serviço de Patologia Clínica do IPSEMG - Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais é um laboratório que atende pacientes ambulatoriais e hospitalizados, em regime de 24 horas. Os hemogramas são rotineiramente realizados por dois equipamentos automatizados com diferencial de 5 partes.

**Objetivos:** Implantar um programa de Garantia da Qualidade do Hemograma Automatizado com base nos requisitos dos programas de acreditação DICQ (SBAC), PALC (SPBC) e LAP (CAP).

**Material e Métodos:** Este trabalho descreve a implantação do Programa de Garantia da Qualidade do Hemograma Automatizado segundo as normas dos programas de acreditação do DICQ (SBAC), PALC (SPBC) e LAP (College of American Pathologists). As listas de requisitos dos programas foram avaliadas e um planejamento para o atendimento de seus requisitos foi feito e implementado para os equipamentos Cell Dyn 3000, 3700 e T-890. As normas foram gradativamente implantadas segundo o planejamento e as estratégias de implantação foram avaliadas periodicamente e modificadas gradualmente.

**Resultados:** Foram determinados os Coeficientes de Variação (CV) das análises quantitativas incluindo Hemácias, CHCM, Global de Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos e Plaquetas para os dois equipamentos Cell Dyn. Os respectivos CV encontrados estão abaixo dos limites de aceitabilidade preconizados por Dacie & Lewis, 1985. Foram realizados estudos de linearidade quanto a Hemácias, Leucócitos e Plaquetas para os três equipamentos, com resultados aceitáveis. Foram feitos testes estatísticos para avaliar concordância dos resultados das determinações de Hemácias, Leucócitos e Plaquetas através de regressão linear, com resultados aceitáveis ( $r > 0.90$ ).

**Conclusão:** No período de Janeiro de 2001 a Janeiro de 2002, o sistema foi continuamente avaliado e os resultados permitem concluir que o sistema implantado é satisfatório. A divulgação da implantação deste programa de Garantia da Qualidade pode ser importante como modelo para outros laboratórios que ainda estão em fase de implantação de tais sistemas segundo as normas de acreditação.

**PALAVRAS-CHAVE** – Hemograma, controle da qualidade, garantia da qualidade, acreditação.

**SUMMARY** – The IPSEMG (Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais) Hematological Sector is responsible for 24 hours urgent and routine FBC (Full Blood Counts) or CBC (Complete Blood Counts) analysis. This exam is performed in two automated 5 parts differential equipments. This paper describes the basic tenets of an Assurance Quality Control Program that was based on DICQ (SBAC), PALC (SBPC) and LAP (CAP) guidelines. In 1998 the Hematological Sector started the development of accreditation requirements from the above mentioned agencies. This was followed by the design and implementation of corresponding structure aimed at fulfilling those requirements. From that, a global Quality Assurance Strategy was developed aiming mainly at detecting errors in the preanalytical, analytical and postanalytical phases of FBC/CBC examination. Finally, acceptable rules for Quality Control (QC) were selected and a comprehensive QC strategy was adapted for local use. We present data from January 2001 to January 2002 to illustrate those rules and strategies.

**KEYWORDS** – Complete blood count, quality control, quality assurance, accreditation.

## INTRODUÇÃO

A Garantia da Qualidade na Hematologia tem o objetivo de assegurar a confiabilidade dos testes hematológicos, no caso, o Hemograma Automatizado, em todas as fases (pré-analítica, analítica e pós-analítica). Quanto à fase analítica, é necessário obter imprecisão e inexatidão aceitáveis. A exatidão relaciona-se com a aproximação do valor obtido em relação ao valor considerado real da amostra. A precisão relaciona-se com a reprodutibilidade de um resultado, seja ele exato ou não.

Com a tecnologia atual, a validação do Hemograma Automatizado deve ser obtida por meio de programa de Garantia da Qualidade permanente e rigoroso. Para que este programa seja efetivo, é essencial determinar tarefas e responsabilidades, ter acesso a informações clínicas de pacientes e revisar continuamente os dados disponíveis. Os procedimentos de Garantia da Qualidade aqui descritos estão baseados nos requisitos dos programas de acreditação DICQ (SBAC), PALC (SBPC) e LAP (College of American Pathologists).

O Serviço de Patologia Clínica (Hospital Governador Israel Pinheiro – IPSEMG) é um laboratório geral

Recebido em 8/7/2002

Aprovado em 12/7/2002

Prêmio PNCQ - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

\*Serviço de Patologia Clínica do Hospital Governador Israel Pinheiro, IPSEMG, Belo Horizonte, MG

<sup>1</sup>Bioquímica responsável pelo Setor de Hematologia; <sup>2</sup>Médica Patologista Clínica do Serviço de Patologia Clínica;

<sup>3</sup>Médico Hematologista do Serviço de Patologia Clínica.

que tem um Setor de Hematologia que realizava, no período de Janeiro de 2001 a Janeiro de 2002, em média, 450 Hemogramas/dia. O equipamento Cell-Dyn 3000(Abbott) realizava principalmente os Hemogramas provenientes de pacientes ambulatoriais e o equipamento Cell-Dyn 3700(Abbott) realizava principalmente os Hemogramas provenientes de pacientes hospitalizados e urgências. O equipamento T-890 (Beckman-Coulter) era mantido em funcionamento, mas só era utilizado para algumas amostras de recém-nascidos (sangue heparinizado) e pacientes com leucócitos acima de 150.000/mm<sup>3</sup>. Esse equipamento, no período estudado, não foi utilizado como equipamento *back-up*, pois os equipamentos Cell-Dyn foram suficientes para a demanda. Os equipamentos Cell Dyn operam em módulo aberto (aspiração manual da amostra) e módulo fechado (aspiração automática das amostras). Sabe-se que estas duas formas de aspiração podem apresentar desempenhos diferentes, havendo necessidade de controlá-las isoladamente e para cada equipamento.

## MATERIAIS

- Lista de verificação do DICQ (SBAC)
- Lista de verificação do PALC (SBPC)
- LAP Checklist (CAP)
- Software de CQ do Cell-Dyn 3000 e 3700.
- Programa estatístico EXCEL.
- Sangue controle do fabricante em três níveis (normal, alto e baixo) - Sigla CC
- Sangue controle de paciente, amostras colhidas em triplicata aleatoriamente – Sigla CP
- Amostras enviadas por Programas de Proficiência.
- Analisadores hematológicos Cell-Dyn 3000 e 3700 (Abbott)
- Contador hematológico T 890 (Beckman-Coulter)
- Homogeneizador de amostras.

## MÉTODOS

### 1. Garantia da qualidade da fase pré-analítica

Nosso programa compreende a Garantia da Qualidade da fase pré-analítica através da padronização da coleta, identificação, transporte, triagem e armazenamento das amostras. Há também critérios estabelecidos para a rejeição de amostras. A fase pré-analítica tem as suas ocorrências registradas e analisadas criticamente uma vez ao mês.

### 2. Controle interno da qualidade da fase analítica

Quanto à fase analítica, são realizadas as seguintes atividades de Controle Interno da Qualidade:

- 1) Medidas de controles do fabricante no sistema analítico principal Cell-Dyn 3000 (avaliação da precisão)
- 2) Medidas repetidas de testes de Controles de Pacientes - CP (testes de replicatas nos dois equipamentos analíticos Cell Dyn no módulo aberto e fechado).

- 3) Análise estatística diária de dados de pacientes obtidos durante a realização da rotina (Médias Móveis - Bull).
- 4) Determinação da comparabilidade dos resultados de pacientes entre os equipamentos para assegurar que não há diferença significativa entre os mesmos a cada seis meses.
- 5) Determinação da linearidade dos parâmetros Hemoglobina, Leucócitos e Plaquetas a cada seis meses nos três equipamentos.

### 2.1 Uso do sangue Controle Comercial (CC)

Existem procedimentos estabelecidos para o uso do Sangue Controle Comercial do fabricante no sistema analítico principal (Cell Dyn 3000) que incluem:

- 1) Determinação dos limites de tolerância (Média, DP e CV) para cada novo lote de sangue controle comercial próprios do equipamento para os parâmetros Hemácias, CHCM, Plaquetas, Leucócitos Global, Neutrófilos e Linfócitos.
- 2) Análise diária do Sangue Controle Comercial em três níveis.
- 3) Uso do módulo de QC do equipamento para avaliação do Coeficiente de Variação Cumulativo dos parâmetros Hemácias, CHCM, Plaquetas, Leucócitos Global, Neutrófilos e Linfócitos, diariamente. Os limites de aceitabilidades dos CV são estabelecidos dentro dos limites estabelecidos por Dacie (Tabela I).
- 4) As regras de Westgard (mod. Cembrowsky) são avaliadas e julgadas diariamente a partir do módulo QC do equipamento. Os três níveis são avaliados conjuntamente e visualmente pelo res-

**TABELA I**  
Limites de tolerância para o CV\* do Sangue Controle (Comercial ou Pacientes)

Hemácias (RBC)	4 %
CHCM	5%
Global de leucócitos (WBC)	10%
Plaquetas	15%
Neutrófilos	10%
Linfócitos	10%

\*Critérios clínicos para aceitabilidade do CV, segundo Dacie.

**TABELA II**  
Regras Múltiplas de Westgard (Mod. Cembrowski)

Regra 1	Um valor fora de 3 DP (1 3s)
Regra 2	Dois valores consecutivos fora de 2DP do mesmo lado (2 2s)
Regra 3	Dois valores consecutivos fora de 2 DP (sentidos opostos) – (R 4s)
Regra 4	Dois ou três valores consecutivos fora do mesmo 2 DP (2 de 3 2s ou 3 de 3 2s)
Regra 5	Quatro valores consecutivos fora de 1DP (4 1s)
Regra 6	Dez valores consecutivos do mesmo lado da média (10 Xm)

ponsável, uma vez que o módulo de QC do equipamento julga cada nível separadamente. Na Tabela II, vêm-se os critérios habilitados no módulo QC do equipamento.

### 2.2 Uso do sangue Controle de Paciente (CP)

Todos os dias são colhidos três tubos de sangue em EDTA de um mesmo paciente aleatório e estas amostras são identificadas como "CP". Estas amostras são utilizadas para:

- 1) Controle da precisão do módulo aberto:
  - Controle entre os turnos Manhã e Tarde (replicata intradia módulo aberto) nos dois equipamentos.
  - Controle do interdica (replicata interdica módulo aberto) nos dois equipamentos.
- 2) Controle da precisão do módulo fechado:
  - Controle do módulo fechado a cada batelada de 50 amostras (Replicata intradia módulo fechado) nos dois equipamentos.
- 3) Determinação da comparabilidade entre os sistemas analíticos Cell Dyn 3000 e 3700 e entre Cell Dyn 3000 e T-890 a cada seis meses.

### 2.3 Uso das médias móveis dos índices hematimétricos de pacientes

Os limites para as médias de VCM, HCM e CHCM foram estabelecidos para a população atendida pelo serviço (segundo Bull) e estão informados no módulo QC do equipamento. As médias móveis são avaliadas nos três turnos de trabalho.

**NOTA:** Os resultados do Sangue Controle Comercial, das replicatas do Controle de Paciente e das Médias Móveis não são julgados isoladamente. Caso se suspeite de algum problema analítico, após a sua investigação e, se necessário, correção do problema, reanalisam-se novas medidas dos controles, afim de verificar a correção da anomalia.

### 2.4 Prevenção da ocorrência de erros aleatórios

Todos os métodos de CQ apresentam vantagens e limitações. A adequação da metodologia à realidade do setor deve se iniciar com a familiarização com os equipamentos disponíveis. Depois, devem ser estabelecidos os métodos de CQ desejados e estes aprimorados a intervalos, por exemplo, semi-anualmente. Erros aleatórios são, entretanto, de caracterização difícil e podem demorar bastante tempo para serem identificados, localizados e corrigidos. O Setor pesquisou e listou as causas mais comuns de resultados falsos (positivos ou negativos) no Cell-Dyn e esta lista é usada para auxiliar na prevenção e investigação de problemas analíticos. (Tabela III).

### 2.5 Comparação entre os sistemas analíticos

Os programas de acreditação recomendam que, quando equipamentos diferentes forem utilizados para a mesma finalidade, eles devam ter seu desempenho comparado a cada seis meses pelo menos. Uma amostra de Sangue Controle de Paciente é analisada 5 vezes a cada dia em cada um dos equipamentos, gerando assim três conjuntos de dados de replicata. Calcula-se a média de cada conjunto e os dados são plotados em Gráfico de Regressão Linear em planilha Excel para os parâmetros hemácias, leucócitos, plaquetas. A aceitabilidade da comparação é julgada através da análise dos Coeficientes de Correlação (r) superior a 0,9.

**TABELA III**  
**Causas comuns de resultados falsos no Cell-Dyn**

Problema	Causas mais frequentes
<b>Global falsamente elevada</b>	Presença de eritroblastos Presença de plaquetas gigantes Amostra com HbF ou neonatal
<b>Global falsamente reduzida</b>	Amostra estocada por mais de 3 dias Presença de anticorpos antileucócitos ou antiplaquetas Aglutininas a frio
<b>Causas de Hb falsamente elevada</b>	Leucocitose extrema Paraproteinemia ou crioglobulinas
<b>Medidas alteradas de Ht, Hm e Índices</b>	Leucocitose extrema Aglutininas a frio Pan-aglutinação induzida por EDTA Fragmentação hemática excessiva Hemólise intravascular
<b>Medidas alteradas de plaquetas</b>	Amostra parcialmente coagulada Início de agregação plaquetária na coleta Agregação induzida por EDTA Satelitismo plaquetário Plaquetas gigantes Hemácias microcíticas Fragmentação hemática excessiva Crioglobulinas Fragmentação leucocitária

### 2.6 Delta Checks

Os *Delta Checks* são testes estatísticos realizados nos resultados quantitativos subsequentes do mesmo paciente. As verificações de *Delta Check* implicam em que resultados inesperados de um teste de paciente devem ser verificados para que possam ser explicados em termos de correlação clínica ou quanto aos resultados de outros testes. As diferenças não devem ser superiores a 10% para Hb e Hm e 20-25% para a global de Leucócitos e Plaquetas, desde que o quadro clínico do paciente em estudo tenha se mantido estável. Pacientes selecionados são acompanhados através da análise seqüencial dos resultados em pastas especiais dentro de arquivos próprios nos equipamentos. Adicionalmente, semanalmente todos os casos hematológicos selecionados para delta check são discutidos em reuniões com a equipe da Hematologia Clínica do Hospital para alterar alterações verificadas e antecipar mudanças nos quadros clínicos devidas a intervenções terapêuticas.

### 2.7 Controle Externo da Qualidade

O Controle Externo da Qualidade tem por objetivo avaliar a comparabilidade de resultados entre laboratórios (mas não necessariamente a exatidão "strictu sensu"). É essencialmente uma avaliação retrospectiva, em geral organizada por uma instituição de padrão nacional, que coordena o envio de amostras e a análise dos resultados de um número de laboratórios participantes. O Serviço participa do PELM (SBPC).

O Laboratório participa do PELM e recebe as amostras para Controle Externo do Hemograma com a periodicidade determinada pelo Programa. As amostras são analisadas pelo sistema analítico principal (Cell-Dyn 3000) da mesma forma que as amostras de pacientes. Os resultados são avaliados pelo Programa e as respostas inadequadas porventura recebidas são analisadas criticamente e são tomadas ações corretivas quando necessário.

### 3. Fase pós-analítica

Valores críticos são os que requerem avaliação hematológica e comunicação imediata com o médico assistente, caso o histórico do doente não seja conhecido ou tenha se alterado bastante em relação aos exames anteriores. Foram estabelecidos utilizando como critério a importância clínica e são verificados diariamente pelas pessoas capacitadas do serviço. (Tabela IV).

### 4. Gerenciamento de dados e responsabilidades

O gerenciamento dos dados do Controle da Qualidade fica a cargo de pessoal de nível superior, previamente treinado na técnica do hemograma automatizado e familiarizado com os procedimentos básicos de CQ.

Diariamente, os gráficos dos controles do fabricante, com 3 níveis, são analisados visualmente e impressos quando necessário para registro de ação corretiva e semanalmente para arquivamento. Os dados do algoritmo de Bull são analisados e impressos duas vezes ao dia (13:00 e 18:30H – trocas de turno). As planilhas de variações intradia (entre bateladas de 50 exames cada – módulo fechado) são atualizadas diariamente, na planilha Excel do computador do Setor. As planilhas dos testes de replicata (interdia) são analisadas pelo software do equipamento e impressas sempre que se troca de controle de paciente (CP), isto é, a cada 2 dias. Diariamente esses dados de CV das replicatas analisadas nos dois módulos dos dois equipamentos são informados em planilhas Excel. Mensalmente os CV médios encontrados são plotados em gráfico para melhor visualização e análise crítica. Quando são ca-

**TABELA IV**  
Níveis críticos do hemograma\*

Hemoglobina (g%)	< 6,0
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	< 500
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	< 50.000

\*Novo diagnóstico de leucemia.

racterizadas anormalidades, anotações em formulários próprios delineando condutas e medidas corretivas, são registradas e arquivadas.

## RESULTADOS

### 1. Fase pré-analítica

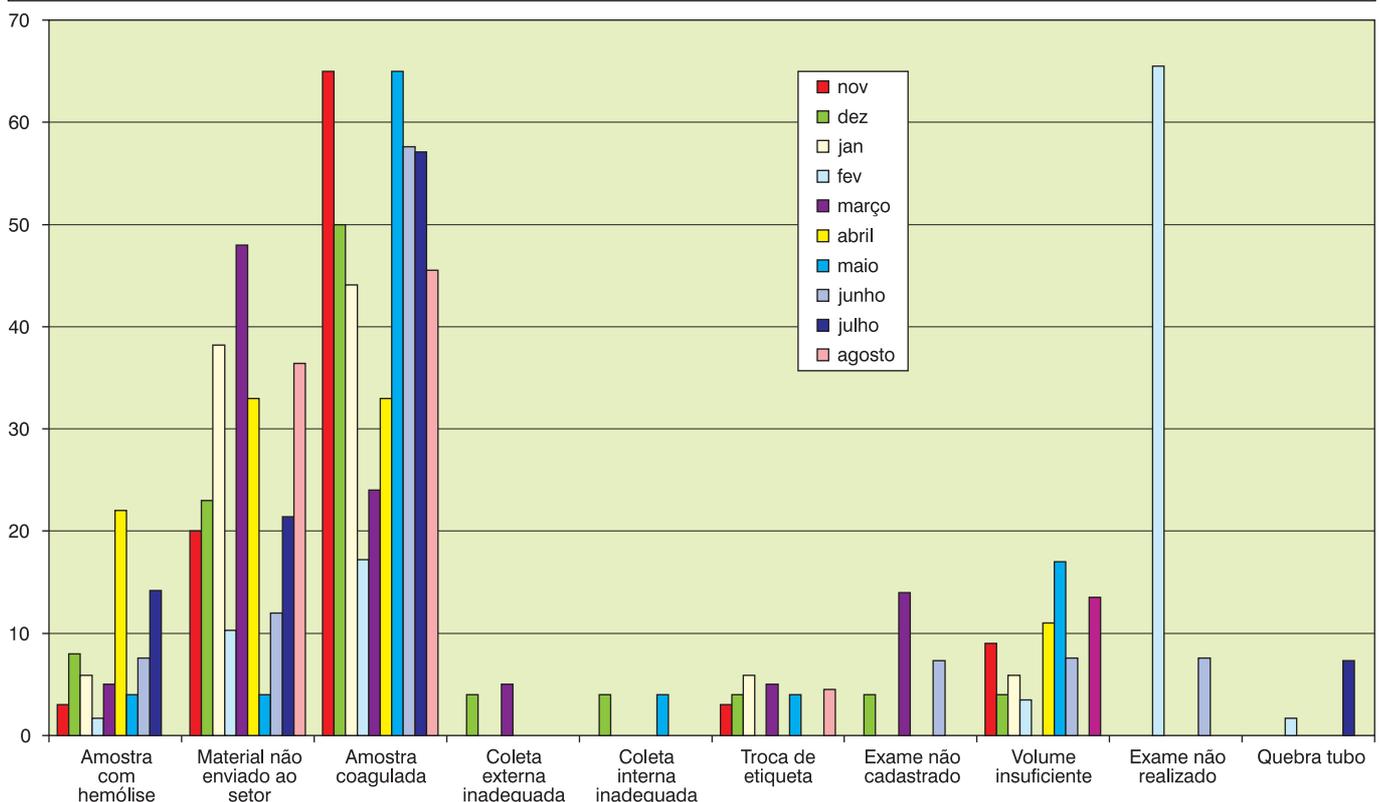
As ocorrências pré-analíticas são tabuladas mensalmente em quantidades absolutas em forma de gráfico de Pareto para a tomada de ações corretivas relativas às ocorrências mais frequentes. (Gráfico 1).

### 2. Fase analítica

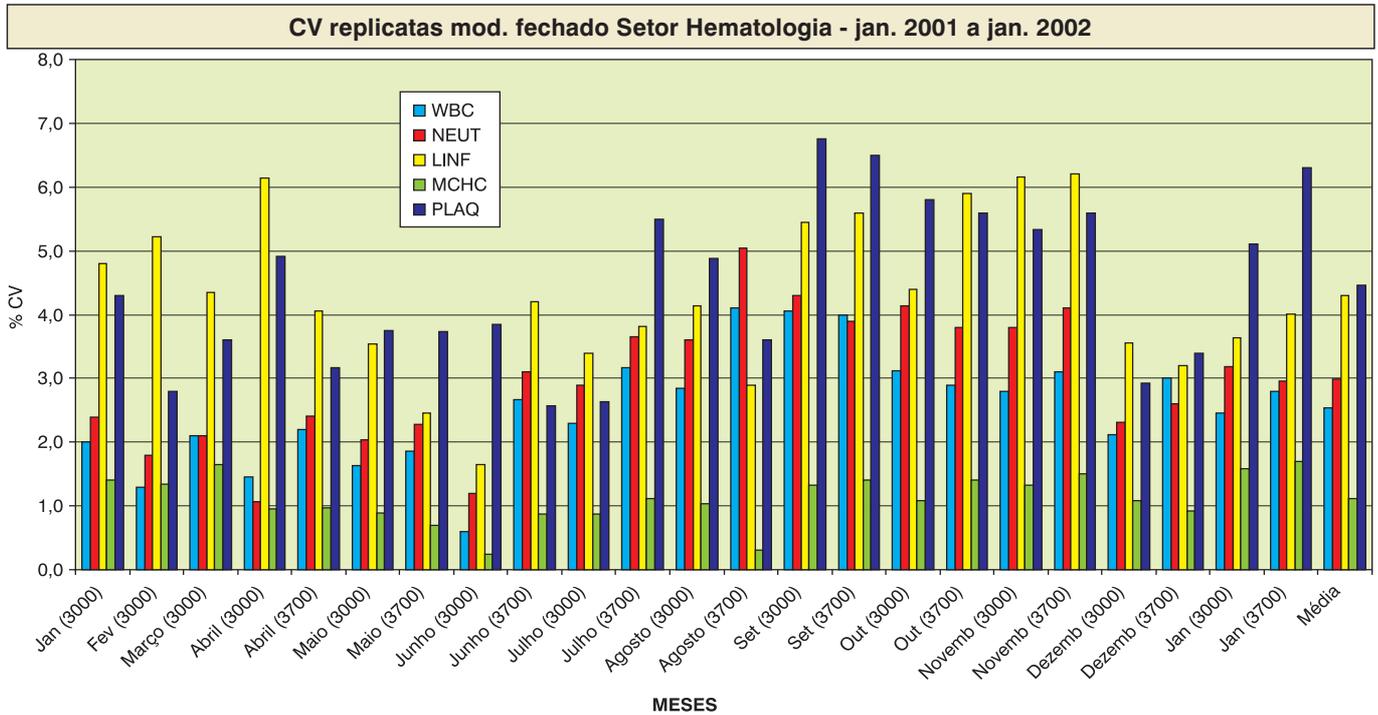
#### 2.1 Coeficiente de variação interdia, módulo fechado

A planilha construída mensalmente em Excel para armazenar o Coeficiente de Variação interdia obtido com replicatas de amostras de pacientes (CP) analisadas em módulo fechado foi consolidada com os valores obtidos durante todo o ano de 2001 nos dois equipamentos (Cell-Dyn 3000 e 3700). (Gráfico 2).

**Ocorrências pré-analíticas Hematologia - nov. 2000 a ago. 2001**



**GRÁF. 1 - Exemplo de histograma de frequência de ocorrências pré-analíticas.**



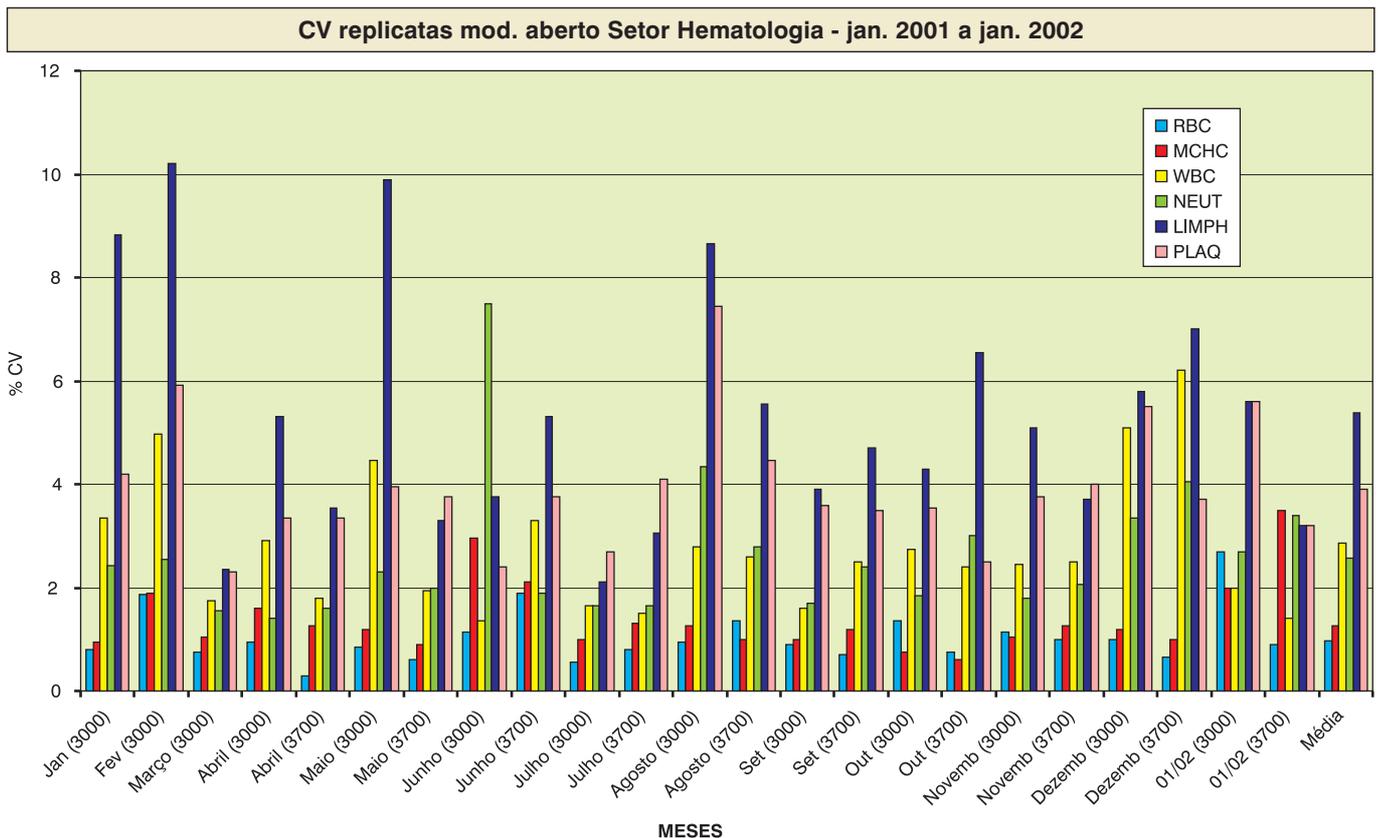
**GRÁF. 2 - Coeficiente de Variação Médio Interdia, mensal, para CHCM, Plaquetas, Neutrófilos e Linfócitos para análises realizadas em módulo fechado. Nota: Nos meses de Jan, Fev e Mar de 2000 só utilizávamos o equipamento Cell Dyn 3000.**

### 2.2 Coeficiente de Variação Interdia, módulo aberto

A planilha construída mensalmente em Excel para armazenar o Coeficiente de Variação Interdia obtido com replicatas de amostras de pacientes (CP) analisa-

das em módulo aberto foi consolidada com os valores obtidos durante todo o ano de 2001 nos dois equipamentos (Cell-Dyn 3000 e 3700). (Gráfico 3).

Os parâmetros básicos de imprecisão (desvio-pa-



**GRÁF. 3 - Coeficiente de Variação Médio Interdia Mensal para WBC, RBC, CHCM, Plaquetas, Neutrófilos e Linfócitos para análises realizadas em módulo aberto. Nota: Nos meses de Jan, Fev e Mar de 2000 só utilizávamos o equipamento Cell Dyn 3000.**

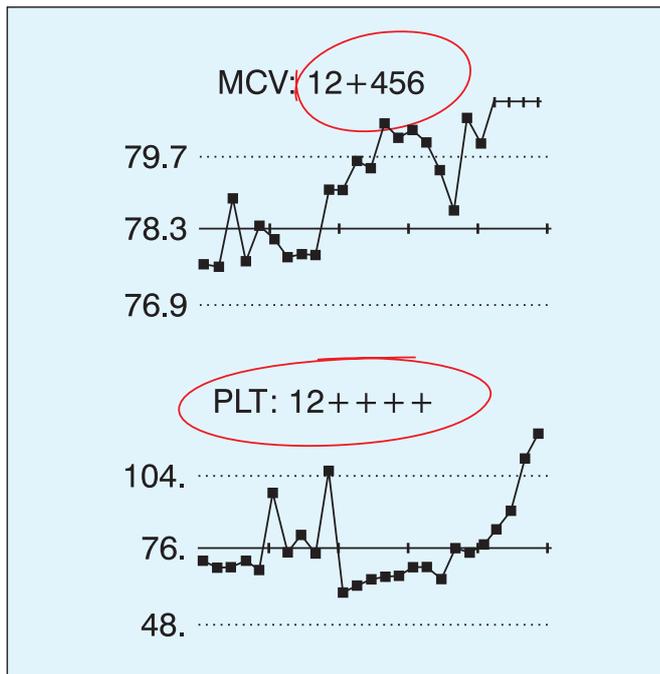
drão e Coeficiente de Variação) dos materiais CC e CP foram caracterizados logo após o início da atividade do equipamento de referência, de modo a estabelecer limites para a imprecisão esperada do equipamento ao longo do tempo. Desta maneira, mostramos na Tabela V os dados iniciais obtidos para o Sangue Controle Comercial (CC) e, na Tabela VI, os dados relativos ao Sangue Controle de Paciente (CP), para o equipamentos Cell Dyn 3000.

**TABELA V**  
**Coeficientes de Variação Interdia de Sangue Controle Comercial em três níveis (CC) no equipamento Cell Dyn 3000 (n= 127)**

Nível	Global de leucócitos (%)	Diferencial (%)	Hb, Ht e Hem (%)	Índices hemáticos (%)	Plaquetas
Baixo	1,8 a 2,8	Neut < 5 Outros <10	< 2	< 3,4	< 6,6
Normal	1,4 a 2,6	Neut < 5 Outros <20	< 1,6	< 2,0	< 3,5
Alto	1,6 a 2,6	Neut < 5 Outr < 20	< 1,4	< 1,3	< 2,9

**TABELA VI**  
**Coeficientes de Variação Interdia de Sangue Controle de paciente (CP) no equipamento Cell Dyn 3000 (n= 17)**

	Global (%)	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Outros leucócitos	Hb, Ht e Hem (%)	Índices Hemáticos
Média	1,7	1,2	5,9	17 a 37	0,6 a 1,1	0,5 a 1,3
Desvio-padrão	0,5	0,7	3,2	15 a 19	0,3	0,3 a 0,5
Limites de variação	0,4 a 2,7	0,4 a 2,7	2,3 a 15	2 a 87	0,2 a 1,7	0,2 a 2,2



**FIG. 1 - Gráfico de Levey-Jennings (Westgard) mostrando o efeito da deterioração do Sangue Controle do Fabricante.**

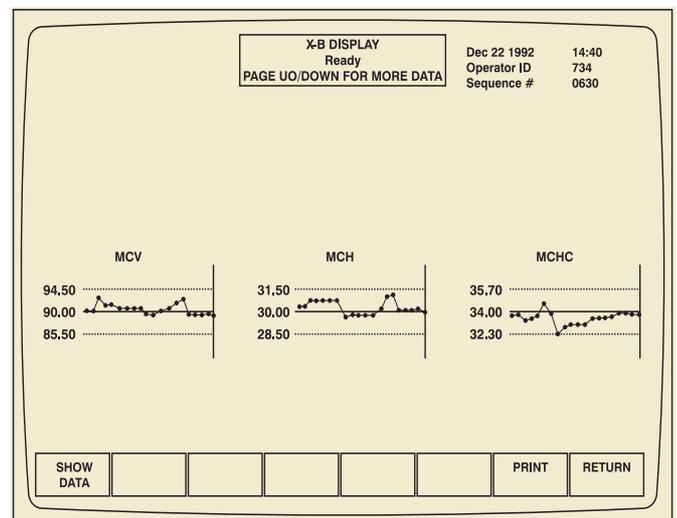
*Efeito da deterioração do Sangue Controle Comercial – Alteração das médias de VCM e plaquetas cerca de 5 dias ANTES da data de vencimento do rótulo, com tendência à aumento em pelo menos 2 níveis (violações mais freqüentes das regras 1,2,4 e 5).*

### 2.3 Médias móveis

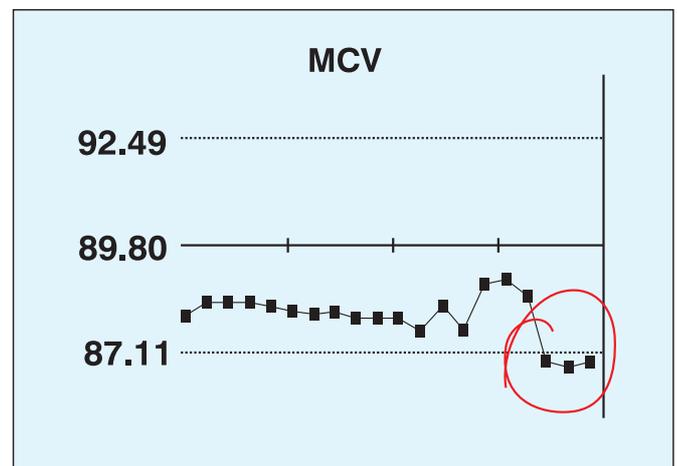
A tabela abaixo mostra os resultados calculados no Serviço de Patologia Clínica do IPSEMG dos limites de variação dos índices hematimétricos segundo a metodologia descrita por Bull para a população atendida. Foram encontrados valores semelhantes aos descritos por Bull. (Tabela VII).

**TABELA VII**  
**Limites de X-B (Bull) para MCV, MCH e MCHC próprios**

Índice hemático	Limite inferior	Média	Limite superior
MCV	85,31	89,80	94,29
MCH	28,78	30,30	31,81
MCHC	31,92	33,60	35,28



**FIG. 2 - Exemplo de resultados de Médias Móveis de Índices Hematimétricos obtidos na rotina (Cell Dyn 3000).**



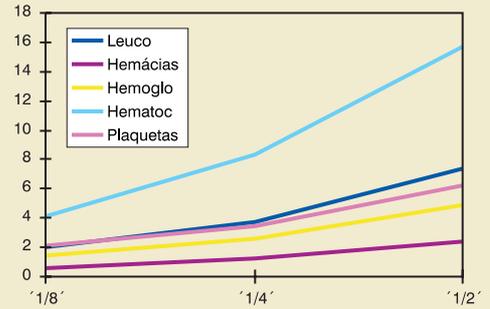
**FIG. 3 - Exemplo de resultados de VCM alterados pelo efeito "fim-de-semana"\*.**

*\*Efeito "fim-de-semana": mudança de população atendida nos planos de fim-de-semana, com queda de VCM e HCM médios nos domingos e primeiras médias acumuladas de segunda-feira, com auto-correção nos primeiros turnos das segundas-feiras.*

## 2.4 Linearidade

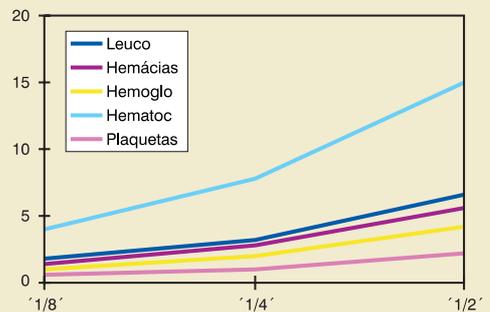
**TABELA VIII**  
Estudo da linearidade do equipamento Cell Dyn 3000

Parâmetros	Diluição '1/8'	Diluição '1/4'	Diluição '1/2'
Leucócitos	2	3,7	7,4
Hemácias	0,62	1,25	2,36
Hemoglobina	1,4	2,6	4,9
Hematócrito	4,1	8,3	15,7
Plaquetas	2,1	3,46	6,22

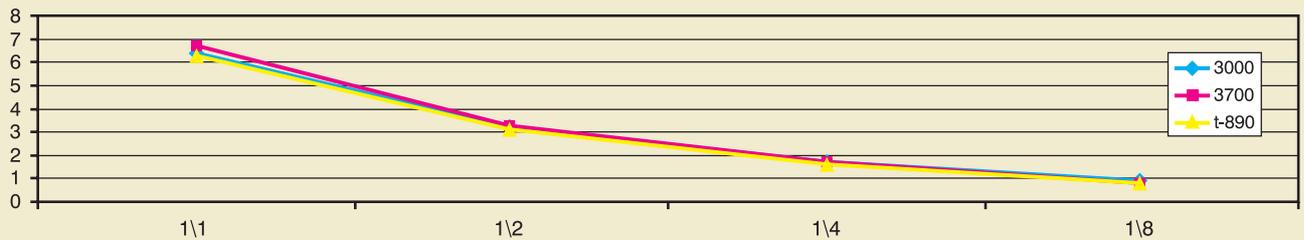


**TABELA IX**  
Estudo da linearidade do equipamento T-890

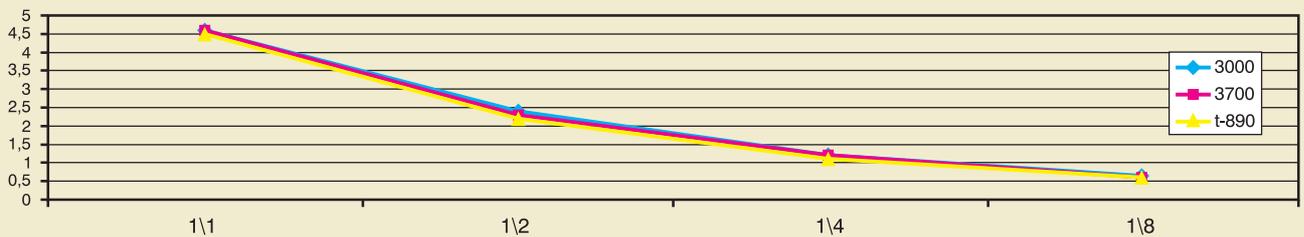
Parâmetros	Diluição '1/8'	Diluição '1/4'	Diluição '1/2'
Leucócitos	1,8	3,3	6,7
Hemácias	0,56	1,1	2,15
Hemoglobina	1,1	2,1	4,2
Hematócrito	4	7,8	15,1
Plaquetas	1,45	2,79	5,55



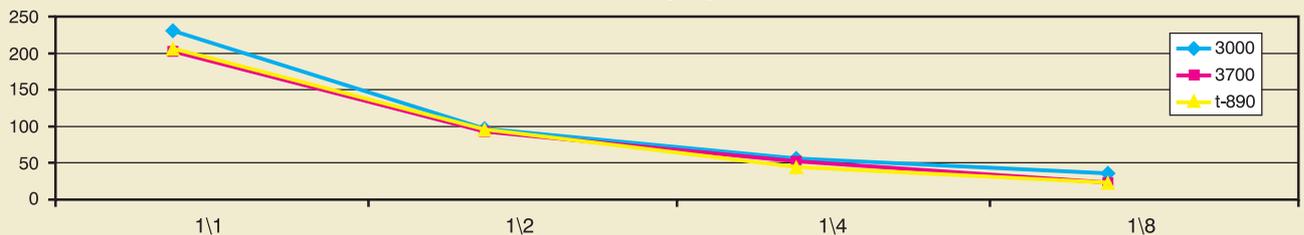
Linearidade de WBC



Linearidade Rbc

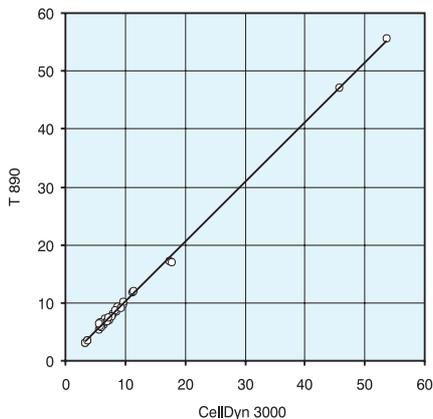


Linearidade plaquetas



GRÁF. 4 - Linearidade da Global de Leucócitos, Hemácias e Plaquetas nos três equipamentos (Cell Dyn 3000, Cell Dyn 3700 e T-890).

## 2.5. Comparabilidade entre os equipamentos

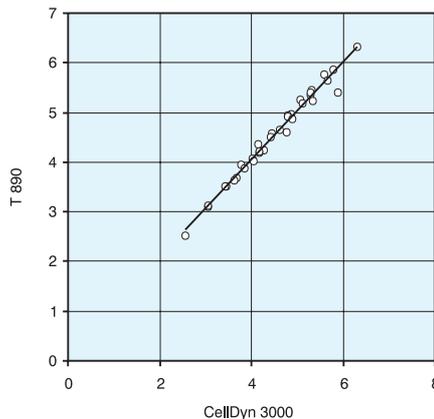


$$T890 = 1,03 \times \text{CellDyn 3000} - 0,0340$$

$$X = 2,5$$

Slope	1.03
Intercept	-0.0340
R (Corr. Coef.)	0.999
Mean of T890	10.3
Mean of CellDyn 3000	10.1
N	34

GRÁF. 5 - Comparação entre contadores hematólogicos Cell Dyn 3000 e T-890 quanto à Contagem Global de Leucócitos (regressão linear) mostrando correlação aceitável.

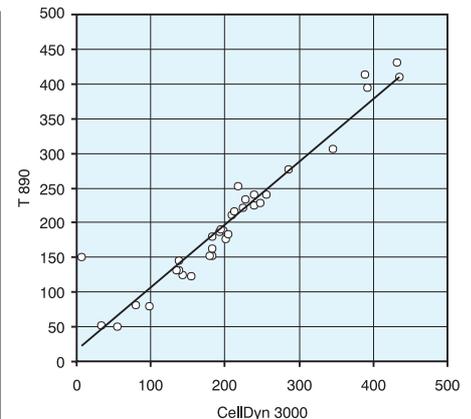


$$T890 = 0,975 \times \text{CellDyn 3000} + 0,149$$

$$X = 0,96$$

Slope	0.975
Intercept	0.149
R (Corr. Coef.)	0.991
Mean of T890	4.56
Mean of CellDyn 3000	4.52
N	34

GRÁF. 6 - Comparação entre contadores hematólogicos Cell Dyn 3000 e T-890 quanto à contagem de Hemácias (regressão linear).



$$T890 = 0,907 \times \text{CellDyn 3000} + 16,2$$

$$X = 0,72$$

Slope	0.907
Intercept	16.2
R (Corr. Coef.)	0.956
Mean of T890	204

GRÁF. 7 - Comparação entre contadores hematólogicos quanto à contagem de plaquetas (exemplo de regressão linear) mostrando correlação aceitável.

## DISCUSSÃO

A meta final da sistemática de Garantia da Qualidade implantada em nosso Serviço é conhecermos nosso Erro Total (compreendido como o impacto das nossas imprecisão e inexatidão) e obtermos Erros para as nossas análises quantitativas dentro dos limites preconizados por entidades representativas como sendo o "estado da arte" atual. Como exemplo, ver o Erro Total Permitido estabelecido pelo CLIA 88: Hemoglobina 7%, Hemácias 6%, Leucócitos 15% e Plaquetas 25%.

Para alcançarmos nossa meta final, o primeiro passo e o mais factível é o estudo da imprecisão através das medidas dos Coeficientes de Variação com o uso de Sangue Controle e de amostras de pacientes. Uma vez implantado o uso de Sangue Controle e de replicatas de amostras para o controle da imprecisão dos equipamentos e obtidos os valores de CV próprios do laboratório (ver Tabelas 5 e 6), coloca-se a seguinte questão: a imprecisão encontrada é aceitável? Para responder a esta questão, baseamo-nos nos limites estabelecidos por Dacie & Lewis para aceitabilidade clínica. Para assegurar que os resultados são clinicamente confiáveis, os Coeficientes de Variação deveriam estar dentro de certos limites percentuais do valor da amostra. Os parâmetros da Tabela X, certamente muito maiores do que os encontrados na maioria das medidas rotineiras pelos equipamentos automatizados, são considerados adequados:

Devido às propriedades físicas e da forma das hemácias, os valores de VCM, HCM e CHCM são controlados dentro de limites fisiológicos estreitos. Os valores encontrados por Bull em 3600 pacientes hospita-

TABELA X

### Limites de aceitabilidade dos CV segundo Dacie & Lewis

Hemácias (RBC) e Hemoglobina (Hb)	3-4 %
Hematócrito (PCV ou Ht), MCV (VCM), MCH (HCM) e MCHC (CHCM)	4 a 5 %
Global de leucócitos (WBC)	8 a 10%
Plaquetas	10 a 15%

(análise dos nossos CV médios, segundo Dacie)

lizados de três continentes foram: VCM = 89,5 fl, HCM = 30,5 pg, CHCM = 34,0 dL. O Coeficiente de Variação esperado é de no máximo 1,3%. Devido a esta restrita variação, uma média destes índices obtida dos resultados de 20 ou mais pacientes subsequentes pode servir como um ponto de referência estável para o programa de Garantia da Qualidade do Hemograma Automatizado. Vários equipamentos automatizados oferecem este parâmetro de controle com o nome X-B. Nossos resultados indicam não haver necessidade de alteração dos limites originalmente descritos. Não há necessidade de que um laboratório determine seus próprios valores, a não ser para uma população muito específica com relação a estes parâmetros. Na nossa experiência, a análise das Médias Móveis ao longo dos turnos representa a melhor avaliação da estabilidade do equipamento. Como seus limites são muito estreitos, as variações da precisão podem ser corrigidas antes de haver impacto clínico. Além do mais, é um parâmetro de controle obtido a custo zero. A única limitação se deve ao fato de que só deve ser utilizado em equipamentos que realizam mais de 100 hemogramas por dia.

O Hemograma se ressent da falta de padrões internacionais estáveis que possam conferir exatidão aos diferentes sistemas analíticos. Devido a isto, os Setores de Hematologia precisam confiar na calibragem realizada com os padrões do fabricante. Em nosso serviço, há ainda o fator complicador da presença de três sistemas analíticos diferentes, os quais realizam exames dos pacientes de forma potencialmente aleatória. Ou seja, o mesmo paciente pode ter o Hemograma realizado nos equipamentos Cell Dyn 3000 e 3700 e, eventualmente, no T-890. Esse fato tornou obrigatória a garantia de que todos os três equipamentos apresentem bias aceitável entre si todo o tempo. Para alcançarmos este objetivo, selecionamos o equipamento Cell Dyn 3000 como sistema analítico principal. As calibrações dos equipamentos Cell Dyn 3700 e T-890 são realizadas em função de obtermos os mesmos resultados do Cell Dyn 3000. A exatidão do equipamento Cell Dyn 3000 é verificada periodicamente através dos resultados dos Testes de Proficiência. Com esta estratégia, garantimos a confiabilidade dos resultados do sistema analítico principal e a comparabilidade dos sistemas secundários.

Devido à dificuldade de conhecermos nosso bias, estabelecemos como meta reduzir ao máximo os Coeficientes de Variação. O CV intradia deverá estar até 1/4 do Erro Total Permitido e o CV interdial deverá estar até 1/3 do Erro Total Permitido. Com isto, "sobra mais espaço" para a inexatidão inerente ao processo analítico do Hemograma.

Finalmente, vale a pena apontar as dificuldades para o uso rotineiro do Sangue Controle Comercial. O atraso na entrega dos lotes novos e a deterioração dos lotes em uso ainda dentro do período de vencimento (vide Gráfico 4) causa dificuldade para o cumprimento do requisito que indica que um lote novo de controle deva ser validado antes do uso. A maneira encontrada para superar esta dificuldade é o uso do algoritmo de Bull e do Sangue Controle de Pacien-

te (CP). As amostras de pacientes são baratas e disponíveis em qualquer laboratório.

## CONCLUSÃO

Concluimos que a implantação de um Programa de Garantia da Qualidade para a realização de Hemograma Automatizado segundo as normas dos programas de acreditação DICQ, PALC e LAP permite ao Setor de Hematologia manter o desempenho da realização do Hemograma Automatizado dentro dos parâmetros de aceitabilidade clínica recomendados.

## AGRADECIMENTOS

À toda a equipe do Setor de Hematologia, que compreende a necessidade da Garantia da Qualidade para a excelência da prática médica.

## REFERÊNCIAS

1. **Ferreira, M. F. R.; Bueno, R. F.; Bastos, M.; Bastos, M. R. D.; Vieira, L. M. F.** Proposta de implantação de controle de qualidade do hemograma automatizado segundo as BPLC. (Apresentado na Jornada Mineira de Patologia Clínica), 1998.
2. **Westgard, J. O.** *Clin. Chem.* v.27, (3), p. 494-501, 1981.
3. **Cembrowski, G. S.** *Lab. Med.* p. 418-421, 1989.
4. **Bull, B. S.; Hay, K. L.** *Arch. Pathol. Lab. Med.* p. 604-606, 1985.
5. **Statland, B. E.; Westgard, J. O.** Quality control: theory and practice. In: *Diagnosis and management by laboratory methods.* Todd-Sanford-Davidson, (7<sup>th</sup> ed), p. 74-93, 1984.
6. **Dacie, J. V.; Lewis, S. M.** Quality assurance. In: *Practical Haematology.* Dacie, J. V.; Lewis, S. M. (8<sup>th</sup> ed.), p. 35-47, 1995.
7. **IPSEMG – SVPCL – POP.** Controle da qualidade do hemograma automatizado.
8. **College of American Pathologists.** Hematology checklists. [www.cap.org](http://www.cap.org)
9. **SBAC – Manual do DICQ.** [www.labconsult.com.br](http://www.labconsult.com.br)
10. **SBPC – Manual do PALC.** [www.labconsult.com.br](http://www.labconsult.com.br)

Endereço para correspondência  
Dr<sup>a</sup> Mônica de F. Ribeiro Ferreira

Alameda Serra do Mar, 35 - Vila del Rei - 34.000-000 - Nova Lima, MG

## Curso de Idioma para a Área de Análises Clínicas e da Saúde

Ensino do inglês e do espanhol para uso do dia-a-dia e técnico, com textos e diálogos voltados para o ambiente do laboratório clínico, além do ensino formal desses idiomas.

Os textos serão revisões técnicas e científicas sobre microbiologia, imunologia, parasitologia, bioquímica, hematologia e citologia.

Público alvo: médicos, farmacêuticos, biomédicos, biólogos e veterinários, além de candidatos e estudantes de graduação e pós-graduação *lato sensu* e *stricto sensu* da área de saúde.

## Fundação Técnico-Educacional Souza Marques

Núcleo de Desenvolvimento de Recursos Humanos - NUDES

Inf.: Tel. (0xx21)3390-6248/6269/6365 - Ramal 218

E-mail: [saudeidiomas@yahoo.com.br](mailto:saudeidiomas@yahoo.com.br)

# A influência da fase pré-analítica no controle de qualidade do diagnóstico colpocitológico\*

## Pre-analytical phase's influence in the quality control of cervicovaginal smear

Heliana de Araújo Silva<sup>1</sup>; Luiz Mário da Silva Silveira<sup>1</sup>; Pollyana Barbosa Farias Corrêa<sup>2</sup> & Maria da Glória Teixeira de Sousa<sup>3</sup>

**RESUMO** – A citologia exfoliativa possui um importante papel na detecção precoce de neoplasias, tem valor único para fins de rastreamento e é um dos instrumentos mais eficientes para a detecção de lesões precursoras em grandes populações. Visando colaborar com a otimização da qualidade diagnóstica da citologia, observou-se o papel representado pelas etapas pré-analíticas na melhoria das fases analíticas e pós-analíticas, com o intuito de se minimizar a incidência de casos falsos-negativos. Realizou-se levantamento de 3.162 fichas de pacientes submetidas ao exame de Papanicolaou em 1998, examinadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA). Agruparam-se os dados para serem avaliados de acordo com variáveis relacionadas às informações prestadas pela paciente. Os resultados permitiram detectar as falhas cometidas e a importância do aperfeiçoamento das fases que antecedem a leitura do escrutinador na obtenção do laudo diagnóstico, sobretudo o não preenchimento adequado dos dados clínicos. A etapa pré-analítica não vem recebendo a atenção necessária quando comparado com as etapas posteriores.

**PALAVRAS-CHAVE** – Esfregaço cervicovaginal, controle de qualidade, citopatologia.

**SUMMARY** – The exfoliative cervicovaginal cytopathology possess an important role in detection of pre-malignant lesions, with efficient diagnostic performance. With the purpose to improve the quality of cervicovaginal smears, this paper assess pre-analytical phase with intention of minimizing the incidence of false negative cases. A survey of 3,162 files of patients submitted to Pap smear screened in LACEN-MA, in 1998, was examined. The data had been grouped and evaluated in accordance with several variables. The results allowed detecting the importance of pre-analytical phase and that it is not receiving the necessary attention when compared with analytical and post analytical phases.

**KEYWORDS** – Cervicovaginal smear, quality control, cytopathology.

### INTRODUÇÃO

A citologia exfoliativa possui um importante papel na detecção precoce de neoplasias, tem valor único para fins de rastreamento e é um dos instrumentos mais eficientes para a detecção de lesões precursoras em grandes populações por seu custo e desempenho diagnóstico<sup>14</sup>.

A literatura tem documentado com clareza a diferença marcante entre a queda da incidência e mortalidade por carcinomas de colo uterino nas regiões onde existem adequados programas de detecção, em relação a regiões onde não é desenvolvido um programa de modo contínuo, que possa alcançar, pelo menos, 60% da população feminina sexualmente ativa<sup>2,13</sup>.

A redução dos índices depende de um conjunto de ações que envolvem médicos, população, frequência e qualidade da coleta, escrutínio e análise diagnóstica, adequada comunicação entre os especialistas e eficácia do sistema de acompanhamento das pacientes para a garantia da qualidade na citologia ginecológica. A obtenção da qualidade depende de um trabalho

multidisciplinar através de uma análise programada, contínua, incluindo todas as estruturas em que se realiza o exame de Papanicolaou, desde os laboratórios públicos e privados, até consultórios médicos, de modo a se permitir um planejamento para ações contínuas de detecção precoce das alterações epiteliais do colo uterino, reduzindo a morbidade e a mortalidade por neoplasia.

No que diz respeito mais diretamente à questão da citopatologia, os pontos básicos a se cuidar para a garantia de qualidade do exame são a coleta e a interpretação diagnóstica.

A partir da década de oitenta, o método citológico veio sofrendo uma série de críticas relacionadas com a alta quantidade de casos falsos-negativos, o que fez, em um dado momento, questionar-se a validade da manutenção dos serviços públicos de prevenção e detecção de câncer de colo uterino em Programas de vários países, inclusive, os Estados Unidos<sup>7,16</sup>. A proporção desse expurgo científico internacional levou alguns a considerar os mecanismos relacionados à garantia de qualidade de diagnósticos citológicos como

Recebido em 8/7/2002

Aprovado em 12/7/2002

Prêmio CFF - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

\*Trabalho realizado no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA).

<sup>1</sup>Professores do Departamento de Farmácia da Univ. Federal do Maranhão e Citologistas do Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA);

<sup>2</sup>Farmacêutica-Bioquímica; <sup>3</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão.

objeto mais importante dessa ciência, até mesmo na frente das mais sofisticadas técnicas de biologia molecular, devido ao grau de interesse suscitado pelo tema<sup>7</sup>.

Visando colaborar com a otimização da qualidade diagnóstica da citologia, realizou-se um levantamento das fichas das pacientes submetidas ao exame de Papanicolaou durante a Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Colo Uterino, promovida pelo Ministério da Saúde em 1998 no Estado do Maranhão realizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA), com o intuito de se observar o papel representado pelas etapas pré-analíticas da colpocitologia na melhoria das fases analíticas e pós-analíticas, ou seja, no reconhecimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. Avaliou-se ainda a influência da presença ou ausência de células da junção escamocolumnar e também dos demais defeitos de adequação das amostras examinadas no laudo definitivo.

Realizou-se análise epidemiológica das pacientes a fim de contribuir com o aprimoramento dos parâmetros para as estratégias de combate ao câncer cervical.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População

A população estudada constituiu-se de pacientes que participaram da Campanha Nacional de Prevenção do Câncer de Colo Uterino, no Estado do Maranhão, promovida pelo Ministério da Saúde (MS), em 1998, atendidas no LACEN-MA.

### Amostragem

A amostragem foi composta das fichas de entrevista e laudos colpocitológicos das referidas pacientes, cujos materiais cérvico-vaginais foram enviados para o Setor de Citologia Oncótica do LACEN-MA. Estes materiais foram colhidos com espátula de Ayre e escova, fixados com KOLPOFIX<sup>®</sup> e depositados em caixas individuais para serem transportados.

No LACEN-MA, anteriormente à leitura, os esfregaços foram corados pelo método de Papanicolaou modificado, montados em Entellan<sup>®</sup> e identificados com números citológicos usando etiquetas auto-adesivas.

### Instrumento de pesquisa

O instrumento de pesquisa foi constituído pelas fichas de exame citológico. As fichas analisadas foram as fornecidas e padronizadas pelo MS. Todas possuíam número de série exclusivo para cada paciente submetida ao exame preventivo. Nestas fichas constavam campos para serem registrados dados de identificação pessoal, clínicos e epidemiológicos. No verso, o diagnóstico citológico padronizado era baseado nas classificações modificadas de Richart e Bethesda.

### Coleta e organização dos dados

Os resultados obtidos foram tabulados e avaliados estatisticamente, empregando-se o Programa EPI-info. Fez-se análise univariada, utilizando-se para as variáveis contínuas o teste t de Student e para as variáveis categóricas o teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

Agruparam-se os dados para serem avaliados de acordo com as seguintes variáveis:

- De acordo com a faixa etária, onde foram distribuídas da seguinte forma:
  - Mulheres com idade menor que 35 anos;
  - Mulheres com idade entre 35 a 49 anos;
  - Mulheres com idade acima de 49 anos.
- De acordo com o grau de escolaridade
- De acordo com a realização do exame citológico anterior;
- De acordo com o tempo transcorrido do último exame;
- Quanto à inspeção do colo;
- Quanto às informações clínicas;
- Quanto à adequação da amostra segundo o TBS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 3.162 fichas analisadas, observou-se que 1.422 (44,97%) das pacientes estavam na faixa etária abaixo de 35 anos de idade, seguido de 1.522 (48,13%) que se encontravam entre 35 a 49 anos de idade e 218 (6,89%) que estavam acima de 49 anos de idade (Tabela I).

Dos dados acima se verificou que a população estudada mais atingida constituiu-se de pacientes abaixo de 49 anos de idade, fase em que a mulher geralmente está em plena vida reprodutiva, sexualmente ativa e que surgem as lesões precursoras ou pré-invasivas do câncer cérvico-uterino, necessitando, portanto, de um maior investimento em temas de prevenção, visando a diminuição do número de casos com reconhecimento tardio, quando já há invasão e o prognóstico não é favorável<sup>12</sup>.

Na Tabela II, levantou-se o nível de escolaridade das pacientes estudadas.

De acordo com os dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de colo em rela-

**TABELA I**  
Amostra estudada segundo a faixa etária.  
Campanha Nacional de Prevenção do Câncer de Colo Uterino, LACEN-MA, 1998

Idade	nº	%
< 35 anos	1422	44,97
35 a 49 anos	1522	48,13
> 49 anos	218	6,89
Total	3162	100,00

**TABELA II**  
Amostra estudada segundo a escolaridade.  
Campanha Nacional de Prevenção do Câncer de Colo Uterino, LACEN-MA, 1998

Escolaridade	nº	%
Analfabeta	890	28,15
1º grau incompleto	1405	44,43
1º grau completo	321	10,15
2º grau	338	10,69
Superior	10	0,32
Sem informação	198	6,26
Total	3162	100,00

ção à escolaridade é de 93,7% das pacientes analfabetas e apenas 0,5% das pacientes universitárias<sup>4</sup> o que demonstra uma maior prevenção por parte das mulheres com grau de instrução mais avançado. Tal estimativa é perfeitamente compreensível, visto que quanto mais eficiente for o nível de conhecimento da mulher, maior será a sua educação preventiva no que diz respeito ao câncer cervical.

Por outro lado, os dados da Tabela II demonstraram que a grande maioria participante da Campanha possuía baixo grau de instrução em relação às de nível superior (0,32%), levando à suposição de que estas últimas, por possuírem maior esclarecimento e melhor nível econômico, já realizam o exame sem necessidade de mobilização governamental, enquanto as demais necessitam de um chamamento público oferecendo uma maior acessibilidade. É importante atentar que em muitas localidades visitadas, o exame nunca tinha sido oferecido em serviço público gratuito, o que constituiu oportunidade para a realização do referido exame.

Com relação a exame citológico anterior, 1.686 pacientes (53,32%) nunca haviam sido submetidas a uma citologia oncológica, 989 (31,28%) já haviam realizado o exame e 487 (15,40%) ignoravam se já o haviam realizado.

O exame de Papanicolaou é o método sob medida para a detecção de lesões precursoras de neoplasias cervicais, assumindo importante papel na prevenção do câncer de colo uterino e como método de rastreamento por ser simples, viável e de precisão diagnóstica. Contudo, no Brasil, ainda existem mulheres que nunca se submeteram à citologia exfoliativa, como se comprovou nesta pesquisa, onde 53,32% da população estudada nunca havia realizado o exame de Papanicolaou.

Em trabalho realizado com pacientes do LACEN-MA, num período de janeiro a dezembro do ano de 1998, foi confirmado este fato, onde foi verificado que 50,8% nunca haviam sido submetidas a uma citologia oncológica<sup>10</sup>.

Foi avaliado se as pacientes já haviam realizado a colpocitologia anteriormente, encontrando-se que 989 (31,28%) delas já haviam feito o exame alguma vez; 1686 (53,32%) nunca haviam realizado e 487 (15,40%) ignoravam se já haviam realizado ou não.

Há a recomendação que o exame de Papanicolaou deve ser feito a cada ano se os resultados anteriores forem normais, a cada seis meses se houver alterações inflamatórias e a cada três meses, juntamente com exames complementares se houver alterações de atipia celular; entretanto, a periodicidade adotada atualmente pelo INCA é de um exame colpocitológico a cada três anos, considerando-se a evolução lenta do câncer cervical, em caso de dois resultados consecutivos negativos.

Esta periodicidade adotada atualmente pelos órgãos governamentais precisa ser criteriosamente avaliada pelo profissional que está fazendo o acompanhamento da paciente, considerando ser o Brasil um país subdesenvolvido onde existem fatores de risco como baixa condição sócio-econômica, baixo grau de instrução, multiplicidade de parceiros, primiparidade precoce, relação sexual precoce, maus hábitos de higiene, pobreza e ignorância que ainda estão presentes em muitas de nossas mulheres.

De acordo com os dados levantados, verificou-se

que boa parte das mulheres não lembrava da última vez que se submeteram ao exame, o que denota a falta de controle por parte das mesmas na periodicidade da realização do exame. Esse fato pode ser minimizado se houver um controle de cada paciente por parte da Unidade ou Posto de Saúde que realiza o exame, através de esquemas ou carteiras de prevenção ginecológica, onde uma via ficaria com a paciente e a outra com o Posto de Saúde, semelhante aos esquemas de vacinação.

Quanto às informações clínicas, dos 3.162 formulários de requisição do exame citopatológico analisados, 2.896 estavam sem informação clínica, o que corresponde a 91,5% do total. Os que constavam de informações clínicas, 266 (8,5%) foram registrados na Figura 1.

Para que uma amostra cérvico-vaginal seja considerada adequada, um dos critérios que deve ser seguido segundo o sistema Bethesda é o de informações clínicas relevantes, pois melhora a credibilidade da avaliação além de esclarecer a correlação dados clínicos x achados citológicos<sup>6</sup>.

Verificou-se que 91,5% do total de fichas analisadas não continham informações clínicas. Isto pode ter ocorrido por:

- falta de treinamento do entrevistador que pode não ter sido orientado da importância desses dados;
- sobrecarga de atendimento, sem o respectivo número de pessoas para fazê-lo;
- o formulário padronizado pelo MS não obrigava o entrevistador a efetuar estas informações para serem usadas no software SISCOLO como fazia com dados como nome da mulher, da mãe e data de nascimento.

Na Figura 1, analisou-se que das 266 fichas com informações clínicas, em 56,20% destas registrou-se a informação "outros", dado vago que não apresenta relevância, podendo esconder grande quantidade de informações; 22,10% eram gestantes, 19,10% faziam uso de hormonioterápicos e 2,60% faziam uso de DIU.

O exame de Papanicolaou tem valor importante na rotina do pré-natal na prevenção do câncer de colo uterino. Em 7.643 gestantes que realizaram pré-natal na Escola Paulista de Medicina, a citopatologia detectou 4,08% de diagnósticos compatíveis com displasia<sup>1</sup>. O exame citológico para o rastreamento do carcinoma de colo uterino, como parte indispensável de conduta pré-

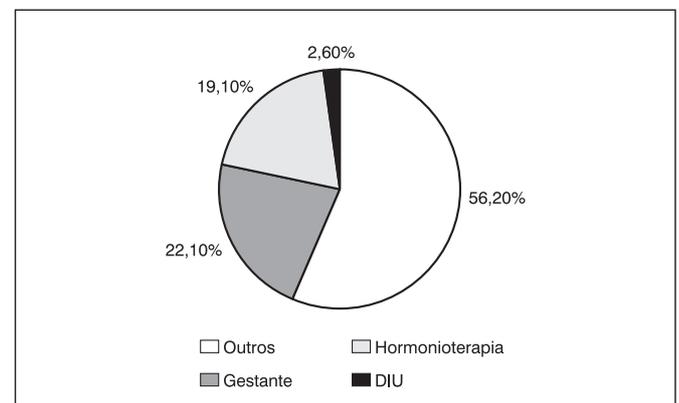


FIG. 1 – Amostra estudada segundo informações clínicas. Campanha Nacional de Prevenção do Câncer de Colo Uterino, LACEN-MA, 1998.

natal, tem se tornado prática rotineira, onde essa oportunidade da procura do serviço ginecológico por ocasião da gravidez, não pode passar despercebido para efetuar prevenção<sup>11</sup>.

O uso de hormonioterápicos e DIU são informações importantes ao citopatologista pois pode esclarecer a presença de células reativas que dificultam a diferenciação com as células neoplásicas, no caso do DIU, e o tipo de padrão do esfregaço no caso dos hormonioterápicos<sup>9</sup>.

Para auxiliar no diagnóstico, sem dúvida alguma o registro de inspeção de colo deve ser feito corretamente. Nesta pesquisa verificou-se que das 3.162 fichas analisadas, apenas 1.899 continham informações sobre a inspeção do colo (Tabela III).

Numa colheita cérvico-vaginal, após a introdução de espéculo, deve-se observar o aspecto do colo: forma, dimensões, eventuais lacerações do mesmo, características dos fôrnices vaginais, do muco cervical e do conteúdo vaginal ou quaisquer alterações observadas a fim de colaborar com o diagnóstico<sup>3</sup>.

Das 1.899 fichas com estas informações, 1.595 registraram que o colo estava sem aspecto tumoral, 230 registraram que o colo estava com aspecto tumoral, 26 com colo ausente e em 48 não foi feita a colposcopia.

Das 230 pacientes com colo com aspecto tumoral, 224 obtiveram laudo citológico negativo para atipias celulares e apenas 6 obtiveram laudo citológico positivo para atipias celulares, não havendo portanto correlação com essas informações e o resultado prático. Deve-se considerar que processos com ectopia podem ser confundidos com aspecto tumoral, pois o tecido glandular possui uma coloração mais avermelhada. Outro achado que deve ser diferenciado é a presença de pólipos. O profissional responsável pela observação do colo uterino necessita ser capacitado para que os referidos fenômenos não sejam confundidos com erosão, mosaico, vasos atípicos e outros aspectos de malignidade tumoral, como provavelmente ocorreu neste caso.

Entende-se por ectopia a presença de um revestimento cilíndrico mucíparo sobre a ectocérvice, e mais precisamente a presença anômala do epitélio de superfície formando pequenas papilas arquitetonicamente muito semelhantes às vilosidades intestinais<sup>3</sup>.

O pólipo cervical é uma protrusão hiperplásica focal da mucosa cilíndrica endocervical, incluindo epitélio e estroma, séssil ou pediculada, que se exterioriza pelo orifício cervical externo. Ocorre mais comumente em mulheres acima de 40 anos e sua transformação em sarcoma é raríssima. Os aspectos suspeitos de carcinoma são o mosaico de campos grandes, o pontilhado grosseiro, áreas esbranquiçadas não cornificadas e epitélio branco<sup>3</sup>.

A adequação da amostra constitui ponto essencial para um diagnóstico seguro e necessita ser mencionada como parte integrante de um laudo citológico, pois possibilita execução posterior de ações corretivas eficazes.

De 3.162 amostras envolvidas, 57,62% foram consideradas satisfatórias no laudo citológico, 39,59% foram consideradas satisfatórias porém limitadas e 2,78% foram identificadas como insatisfatórias para avaliação, ou seja, impróprias para uma interpretação segura e sem credibilidade na detecção de anormalidades epiteliais cervicais.

Estes dados demonstram que pouco menos de 3% das amostras foram recusadas para diagnóstico, não

satisfazendo os critérios básicos para a adequação, o que revela que a grande maioria em relação às etapas pré-analíticas foi executada seguindo padrões de qualidade. Contudo, o percentual de amostras satisfatórias mas limitadas é relevante. Na Figura 2 pode-se identificar os principais motivos que comprometeram as 1.252 amostras consideradas satisfatórias limitadas.

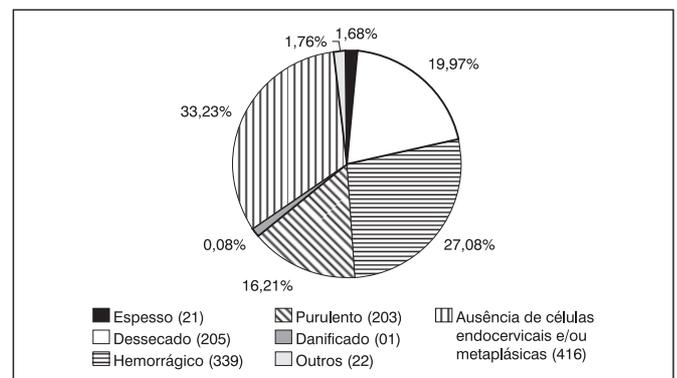
Uma amostra adequada necessita de eficiência nas etapas pré-analíticas tais como a colheita, fixação, coloração, montagem e identificação da lâmina.

De acordo com a Figura 2, os fatores que destacadamente comprometeram a qualidade dos esfregaços foram: ausência de células da junção escamo-colunar, esfregaços hemorrágicos, dessecados e purulentos.

Na Tabela IV observa-se o resultado do laudo citológico dos esfregaços satisfatórios limitados.

**TABELA III**  
**Amostra estudada segundo a inspeção do colo e o resultado da citologia. Campanha Nacional de Prevenção do Câncer de Colo Uterino, LACEN-MA, 1998**

Inspeção do colo	Resultado atual negativo		Resultado atual positivo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Sem tumor	1559	82,0	36	1,89	1595
Com tumor	224	11,7	06	0,31	230
Ausente	26	1,36	—	—	26
Não visto	48	2,52	—	—	48
Total	1857	97,7	42	2,21	1899



**FIG. 2 - Amostra estudada segundo os critérios de comprometimento das citologias satisfatórias limitadas. Campanha Nacional de Prevenção do Câncer de Colo Uterino, LACEN-MA, 1998.**

**TABELA IV**  
**Amostra estudada segundo os critérios de comprometimento das citologias satisfatórias limitadas e o resultado do laudo citológico. Campanha Nacional de Prevenção do Câncer de Colo Uterino, LACEN-MA, 1998**

Critérios	Laudo citológico			
	Sem atipias		Com atipias	
	nº	%	nº	%
Espesso	20	1,59	01	0,07
Dessecado	245	19,56	05	0,39
Hemorrágico	325	25,95	14	1,11
Purulento	201	16,05	02	0,15
Danificado	01	0,07	-	-
Ausência de células da JEC	416	33,22	-	-
Outros	22	1,75	-	-
Total	1.208	98,19	22	1,72

Das lâminas satisfatórias limitadas positivas para atípicas celulares, destacam-se os esfregaços hemorrágicos e dessecados. O mais notável é que praticamente todas as lâminas atípicas consideradas satisfatórias limitadas apresentaram células endocervicais e/ou metaplásicas, o que não ocorreu com as sem alterações atípicas, 33,22%, que não apresentaram representação da JEC.

Estudos cruzados têm repetitivamente demonstrado que esfregaços com células endocervicais tem uma frequência significativamente mais alta e um alto grau de anormalidades escamosas detectadas do que esfregaços com falta de tais células<sup>6</sup>.

Tem sido demonstrado que é na junção escamocolumnar que se originam a maioria das lesões precursoras do câncer de colo e que a presença de um componente endocervical garante uma amostra adequada dessa região, aumentando a probabilidade da detecção de anormalidades cervicais.

O Instituto Adolfo Lutz em estudo sobre a celularidade de 309.452 esfregaços cérvico-vaginais analisados no Setor de Citologia Oncótica, em cinco anos consecutivos, 1992 a 1996, relatando a detecção de NICs nos esfregaços com representação da JEC foi em média 10 vezes maior que nos esfregaços sem representação da mesma<sup>15</sup>.

Estes dados associados aos desta pesquisa evidenciam a importância da amostragem citológica na garantia de qualidade em citopatologia, mais precisamente, da presença da JEC na detecção das neoplasias cervicais.

Além do mais, a ausência da JEC pode esconder alterações celulares, podendo levar a um resultado falso-negativo. Tem havido a preocupação por parte de muitos citopatologistas de que esfregaços que não contenham células da junção escamocolumnar podem não ter revelado áreas displásicas da cérvix<sup>9</sup>.

A ausência de células endocervicais e/ou metaplásicas apresentada foi significativo, considerando-se que a colheita foi realizada com espátula de Ayre e escova, instrumentos que têm sido eficientes na obtenção de células da JEC<sup>8</sup>, o que demonstra possivelmente falha na realização da colheita.

A utilização de "cytobrush" ou escovinha de náilon melhora a precisão diagnóstica oncológica da colheita endocervical, pois penetra com maior facilidade no canal cervical quando feita sua rotação na endocérvice, relatando que apenas 14% dos esfregaços endocervicais com "cytobrush" não contém células cervicais contra 19% dos esfregaços endocervicais realizados com "swab"<sup>3</sup>.

Esse valor de amostras sem representação da JEC pode ser justificado pela não visualização da mesma, principalmente em colo atrófico, onde a junção escamocolumnar localiza-se dentro do canal cervical nas mulheres pós-menopausas e histerectomizadas parcialmente sem reposição hormonal; ou mesmo por treinamento deficiente do coletador.

## CONCLUSÃO

O câncer de colo de útero apresenta evolução lenta e imperceptível e só começa a manifestar-se clinicamente em estágio já avançado. A citologia exfoliativa é arma eficaz na detecção precoce do câncer cervical,

porém a falta de informação ou até mesmo de acesso à mesma tem sido uma barreira na luta contra o câncer.

Algumas falhas foram detectadas, como o não preenchimento das informações clínicas contidas no formulário na grande maioria dos mesmos, além de anotações errôneas da inspeção do colo, revelando a falta de treinamento dos profissionais responsáveis pela entrevista e coleta.

No entanto, há de se destacar como ponto positivo que a maioria dos esfregaços cérvico-vaginais estava satisfatória em relação ao pequeno número de insatisfatórios. Mesmo assim, o percentual de satisfatórios mas limitados ainda foi relevante, merecendo atenção quanto aos motivos do comprometimento dos mesmos, onde se destaca principalmente a ausência de células da JEC, seguido de esfregaço hemorrágico, dessecado e purulento, evidenciando com isso a necessidade de se enfatizar o procedimento pré-escrutínio como peça chave para um bom diagnóstico citológico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão e aos técnicos do Setor de Citopatologia do referido laboratório.

## REFERÊNCIAS

1. Bertini, A. M.; Camano, L. O valor do exame rotineiro de Papanicolaou no pré-natal na prevenção do carcinoma do colo uterino. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*; 14:137-46, 1992.
2. Da Silva, D. P.; Real, O. Screening for cancer of the cervix. Programe of the Central Region of Portugal. *Acta Med. Portuguesa*, 10:643-52, 1997.
3. De Palo, G. *Colposcopia e patologia do trato genital inferior*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993, 435p.
4. Instituto Nacional do Câncer. <http://www.inca.org.br/epidemiologia/cancernobrasil.html>. 07/07/2000.
5. Instituto Nacional do Câncer. [http://www.inca.gov.br/prevencao/colo\\_uterio/index.html](http://www.inca.gov.br/prevencao/colo_uterio/index.html). 20/03/2002.
6. Kurman, R. J.; Solomon, D. *O sistema Bethesda para o relato de diagnóstico citológico cérvicovaginal*. Tradução por Dalton de Freitas Santoro. Rio de Janeiro: Revinter, 1997.
7. Di Loreto, C.; Maeda, M. W. S.; Utogawa, M. L. et al. Garantia de qualidade em citopatologia: Aspectos da correlação citohistológica. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43:195-8, 1997.
8. Luzzatto, R.; Portugal, J. L.; Silva, R. et al. Contribuição da escova endocervical para a acuidade do teste de Papanicolaou: estudo em 26.519 pacientes. *Rev. AMRIGS*. 37:3-6, 1993.
9. Mckee, G. T. *Citopatologia*. Tradução por Nilson D. Martello. São Paulo: Artes Médicas, 1997.
10. Mendes, A. P. S. Associação entre papilomavírus humano e neoplasias intra-epiteliais cervicais. São Luís. *Monografia de Conclusão de Curso de Farmácia - Universidade Federal do Maranhão*. 2000.
11. Pinotti, J. A.; Faundes, A. Cuidado obstétrico e ginecológico às mulheres do 3º mundo. *Rev. Ginecol. Obstet. Bras.* 7:17-27, 1984.
12. Pinotti, J. A. *Como enfrentar o câncer ginecológico e mamário*. São Paulo: UNICAMP, 1986, 80p.
13. Rolnick, S.; La Ferla, J. J.; Wehrle, D. et al. Pap smear screening in a health maintenance organization: 1986-1990. *Preventive Medicine*. 25:156-61, 1996.
14. Schneider, M. L.; Schneider, V. *Atlas diagnóstico diferencial em citologia ginecológica*. Rio de Janeiro: Revinter, 1998, 165p.
15. Shirata, N. K.; Pereira, S. M. M.; Cavaliere, M. J. et al. Celularidade dos esfregaços cérvico-vaginais: importância em programas de garantia de qualidade em citopatologia. *J. Bras. Ginecol.* 108:63-6, 1998.
16. Tabbara, S. O.; Sidawy, M. K. Evaluation of the 10% rescreen of negative gynecologic smear as a quality assurance measure. *Diagnostic Cytopathology*, 14:84-6, 1996.

Endereço para correspondência

Profª Heliana de Araújo Silva

Rua Santa Rita, 487 - Centro - 65015.430 - São Luís, MA

# O fragmento 1+2 da protrombina (F 1+2) e a proteína C ativada em pacientes de risco e com doenças coronarianas

## Prothrombin fragment 1+2 and activated protein C in patients with risk factors and coronarian diseases

Christiane Vieira Reis<sup>1</sup>; Lauro Mello Vieira<sup>2</sup>; Luci Maria Sant'Anna Dusse<sup>2</sup>; Eduardo Ferraz Coelho<sup>1</sup>; Geralda de Fátima Guerra Lages<sup>3</sup>; Milton Luiz de Freitas<sup>4</sup>; Márcio Ribeiro Diniz<sup>4</sup>; Cyntia do Carmo Costa<sup>4</sup> & Maria das Graças Carvalho<sup>2</sup>

**RESUMO** – Uma análise da proteína C ativada e do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) foi realizada com o objetivo de verificar o grau de ativação da cascata da coagulação em situações onde os sistemas da coagulação e da anticoagulação estão teoricamente comprometidos. Foram estudados 20 pacientes com doenças coronarianas, notadamente, angina de peito (n=8) e infarto agudo do miocárdio (n=12), além de pacientes potencialmente em risco de desenvolver doença cardiovascular (n=17). O grupo infarto foi pareado com indivíduos saudáveis dos pontos de vista clínico e laboratorial (grupo-controle, n=12). Somente os resultados de proteína C do grupo controle em relação ao grupo de risco mostraram-se significativos. Para os demais resultados de proteína C e F1+2 não foi observada diferença significativa entre os grupos. No entanto, uma correlação inversa e significativa ( $r = -0.743$ ;  $p < 0.05$ ) foi observada quando se compararam os resultados dos dois parâmetros avaliados para o grupo infarto (proteína C ativada e F1+2). Os resultados descritos acima sugerem um comprometimento da eficiência do mecanismo da anticoagulação natural o que, provavelmente, resultaria em maior geração de trombina, comprovada pela correlação inversa e significativa entre os níveis plasmáticos de F1+2 e proteína C ativada.

**PALAVRAS-CHAVE** – Hemostasia; fragmento 1+2 da protrombina; proteína C ativada.

**SUMMARY** – Activated protein C and prothrombin fragment 1+2 (F1+2) analyses were carried out aiming to investigate the activation status of the coagulation cascade for conditions in which the coagulation and anticoagulation systems are theoretically abnormal. Twenty patients with coronarian diseases, namely angina pectoris (n=8) and acute myocardial infarction (n=12) were studied in addition to patients potentially in risk of developing coronarium disease (n=17). The infarction group was matched to healthy subjects under the clinical and laboratory points of view (control n=12). Protein C and F1+2 results did not show difference among the groups, except protein C results for the control group compared to risk group ( $p < 0.05$ ). However, an inverse and significant correlation ( $r = -0.743$ ;  $p < 0.05$ ) was observed between protein C and F1+2 results in patients with coronarian diseases. This suggests an impairment of the natural anticoagulation system in patients with coronarian diseases resulting probably in an increased thrombin generation confirmed by significant correlation to F1+2 plasma levels.

**KEYWORDS** – Hemostasia; prothrombin fragment 1+2; activated protein C.

### INTRODUÇÃO

A hemostasia é resultante do equilíbrio entre proteínas procoagulantes e anticoagulantes, na qual estão envolvidos os vasos, as plaquetas, as proteínas da coagulação e da fibrinólise e os anticoagulantes naturais. Todos esses componentes estão interrelacionados entre si, constituindo os sistemas da coagulação, da anticoagulação e da fibrinólise<sup>1</sup>.

Muitos fatores, genéticos ou adquiridos, podem contribuir para romper esse equilíbrio levando à estados de hipo ou hipercoagulabilidade. Como manifestação de um

estado de hipercoagulabilidade, a trombose constitui um problema clínico de considerável gravidade e morte ocasional<sup>2-5</sup>. Esta doença apresenta alta incidência e tende a ocorrer em conjunto com algumas situações de risco como cirurgias, fraturas, estados inflamatórios, imobilização, gravidez e uso de contraceptivos orais<sup>4</sup>. Além disso, muitas vezes a trombose está relacionada com fatores de risco genéticos. As alterações genéticas conhecidas, associadas com trombofilia hereditária incluem deficiências de proteína C, proteína S, antitrombina III e disfiibrinogenemia. Essas deficiências em conjunto explicam cerca de 5 a 10% dos casos de trombooses<sup>5</sup>.

Recebido em 28/5/2002

Aprovado em 4/7/2002

<sup>1</sup>Mestres em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da UFMG;

<sup>2</sup>Professores adjuntos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da UFMG;

<sup>3</sup>Farmacêutica bioquímica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da UFMG;

<sup>4</sup>Serviço de Pronto Atendimento, Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

O fragmento 1+2 da protrombina é um polipeptídeo de 43 Kd<sup>6</sup> liberado da porção aminoterminal da protrombina durante a conversão dessa em trombina<sup>7,8</sup> mediada pelo complexo protrombinase formado durante a coagulação sanguínea<sup>9</sup>. Portanto, concentrações plasmáticas de F1+2 refletem a geração da trombina *in vivo*<sup>6,7,10</sup>.

Níveis elevados de F1+2 são observados em condições hereditárias protrombóticas como a deficiência de AT-III, proteína C e proteína S<sup>11</sup> e em condições adquiridas caracterizadas pela ativação da coagulação tais como coagulação intravascular disseminada, tromboembolismo<sup>12</sup>, acidente vascular cerebral, angina instável e infarto do miocárdio<sup>8</sup>. Fisiologicamente, níveis elevados de F1+2 são detectados em indivíduos idosos<sup>13</sup>.

A proteína C é uma glicoproteína dependente de vitamina K, com peso molecular de 62 Kd. Essa proteína é sintetizada no fígado e circula no plasma em concentrações de 3 a 5 mg/L, com meia-vida de 6 a 8 horas<sup>2,14</sup>. A trombina é uma serino protease fisiologicamente importante que pode converter a proteína C na sua forma ativa. A velocidade de reação é lenta quando o coágulo é formado *in vitro*, mas é acelerada, cerca de 20.000 vezes, na presença de um cofator existente na superfície do endotélio vascular, que é a trombo-modulina<sup>2</sup>. A trombo-modulina forma um complexo 1:1 com a trombina, que rapidamente ativa a proteína C em presença de íons cálcio. Uma vez ativada, a proteína C inativa os fatores Va e VIIIa que são cofatores da cascata da coagulação<sup>15</sup>. O principal cofator da proteína C ativada (PCA) é a proteína S, uma glicoproteína produzida no fígado dependente de vitamina K, com massa molecular de 69 Kd<sup>14</sup>. A proteína S atua aumentando a afinidade da PCA pela carga negativa dos fosfolípidos formando um complexo ligado à membrana na superfície das plaquetas, micropartículas plaquetárias e células endoteliais. Dessa forma, os fatores Va e VIIIa tornam-se mais acessíveis à clivagem mediada pela PCA<sup>2,14,15</sup>.

O objetivo deste trabalho foi verificar se na doença coronariana a coagulação sanguínea está ativada devido a um comprometimento da eficiência do mecanismo da anticoagulação natural mediado pela PCA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados um total de 49 pacientes compreendendo:

**A** Grupo de 12 pacientes com infarto agudo do miocárdio que apresentaram o quadro clínico de formigamento e dor anginosa típica com duração superior a 30 minutos, sugestivo de infarto agudo do miocárdio com alterações eletrocardiográficas características, acompanhadas da presença de ondas Q patológicas, acrescidas de níveis séricos aumentados da enzima creatina quinase (CK) e sua fração MB (método enzimático com leitura em Cobas Mira). Foram excluídos os pacientes com estas características que faziam uso de aspirina ou outro antiagregante plaquetário,

anticoagulantes (warfarina sódica ou heparina) ou que tinham recebido terapêutica trombolítica antes da coleta da amostra para os testes de coagulação;

**B** Grupo de 8 pacientes que apresentaram sintomatologia clínica de angina de peito. Esses pacientes foram selecionados após realização de eletrocardiograma e dosagem das enzimas cardíacas (CK e CK-MB). Todos os pacientes apresentaram o quadro clínico de dor típica e níveis normais das enzimas cardíacas;

**C** Grupo de 17 pacientes que apresentaram dois ou mais fatores de risco como hipertensão arterial (pressão sistólica  $\geq 140$  mm Hg e pressão diastólica de  $\geq 85$  mm Hg), hipercolesterolemia (níveis de HDL colesterol inferiores a 45 mg/dL e níveis de LDL colesterol superiores a 130 mg/dL), obesidade e tabagismo. Esses pacientes foram selecionados através do Programa de Prevenção à Aterosclerose do Hospital Socor de Belo Horizonte;

**D** Grupo de 12 pacientes sem fatores de risco (grupo-controle), isto é, indivíduos saudáveis sob os pontos de vista clínico e laboratorial, com idade e sexo semelhantes aos dos pacientes infartados. Estes pacientes foram selecionados da comunidade em geral após triagem para excluir qualquer fator de risco.

Para a comprovação da ausência de fatores de risco e de doenças nos indivíduos do grupo controle foram realizados os seguintes exames laboratoriais: glicose oxidase; colesterol total (método enzimático-Trinder); triglicérides (método enzimático-Trinder); colesterol HDL (sistema de precipitação); fosfatase alcalina (método Roy-modificado); creatinina (metodologia utilizando ácido pícrico); uréia (método enzimático - urease); transaminase pirúvica e oxalacética (metodologia de Reitman e Frankel). Para a realização destes testes foram utilizados *kits* da Labtest e da Analisa. Todos os ensaios foram lidos utilizando-se o espectrofotômetro CELM-E-225 D.

Foram excluídos desse grupo os indivíduos que apresentaram doenças renais, endócrinas, hepáticas, autoimunes, idade acima de 65 anos e aqueles que faziam uso de medicamentos que alteravam a coagulação como anti-inflamatórios não esteroidais, anticoncepcionais, ácido acetilsalicílico (AAS), dipiridamol, ticlopidina e anticoagulantes orais.

Os grupos de pacientes com IAM e angina de peito, foram selecionados no Pronto Atendimento (PROCORDIS) do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da Santa Casa. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido (pós-informado) de todos os pacientes e informações clínicas de todos os participantes foram coletadas por meio de uma ficha clínica para posterior correlação com dados laboratoriais.

### Amostra biológica

Foi coletada de cada paciente uma amostra de 15mL de sangue venoso, em citrato de sódio, por meio de tubos do sistema *Vacutainer* (Becton Dickinson). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas durante 15 mi-

nutos, a 3000 rpm. Após a obtenção das amostras de plasmas, essas foram acondicionadas em tubos *Eppendorf*, devidamente identificadas e estocadas à temperatura de cerca de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos testes laboratoriais. Para o grupo controle e de risco, além dos 15mL de sangue em citrato, foram coletadas amostras de sangue em tubo sem anticoagulante (5mL) para realização dos exames bioquímicos.

### Métodos

A determinação dos níveis plasmáticos de F1+2 foi realizada por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays) de sanduiche, empregando o *kit* da Behring Diagnostics (Enzygnost F1+2) e a determinação da proteína C ativada foi feita por ensaio coagulométrico, empregando-se *kit* da Diagnostica Stago (Staclot® Proteína C).

Para a análise estatística foi empregado o programa Systat, versão 8.03. Os dados foram inicialmente submetidos a uma análise descritiva para a obtenção de médias e desvios-padrão. Para testar a existência ou não de diferença significativa entre os grupos para os parâmetros estudados, foi empregada análise de variância (ANOVA) e, quando se verificou a existência de significância, ou seja,  $p < 0,05$ , utilizou-se o teste LSD de Fisher (*Least Significance Difference*) para testar quais os grupos apresentaram diferenças e qual o nível de significância estatística obtido entre elas.

### RESULTADOS

A média e o respectivo desvio-padrão da proteína C ativada (PCA) e fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) em amostras de sangue dos grupos controle, de risco, com angina e com infarto, podem ser observados na Tabela I. Diferença significativa foi observada somente para a PCA entre os grupos de infarto e de risco. ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística dos resultados da determinação dos níveis plasmáticos do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) revelou que não existem diferenças entre as médias dos grupos estudados, embora uma tendência 'a elevação tenha sido observada principalmente nos grupos de risco e infarto em relação ao controle. Podem ser observadas na Figura 1 que as médias dos grupos de risco, com angina e com infarto apresentam valores discretamente superiores quando comparados à média do grupo-controle.

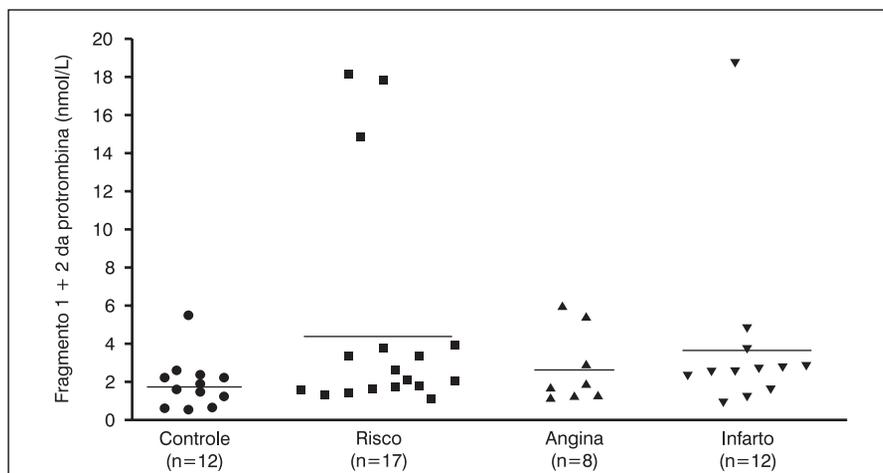
**TABELA I**  
Média e desvio-padrão da proteína C ativada (PCA) e do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) nos grupos estudados

Parâmetros	Controle	Risco	Angina	Infarto
PCA (%) (n=48)	90.4 ± 16.7 (n=12)	101.0 ± 22.7 (n=17)	78.4 ± 23.0 (n=8)	71.4 ± 21.4* (n=11)
F1+2 (nmol/L) (n=49)	1.90 ± 1.33 (n=12)	4.85 ± 5.86 (n=17)	2.64 ± 1.93 (n=8)	3.94 ± 4.78 (n=12)

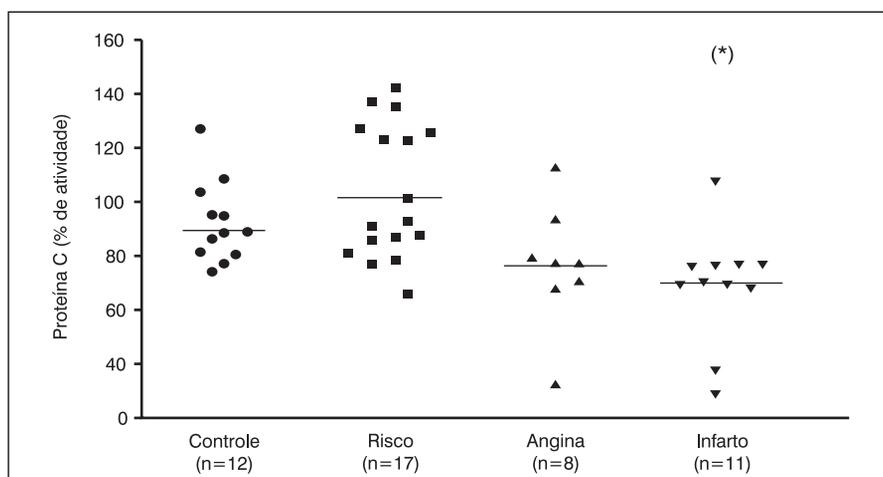
\*Diferença significativa entre os grupos infarto e de risco ( $p < 0,05$ ). Para cada parâmetro e grupo é indicado o número de pacientes (n).

Para a proteína C ativada somente foi observada diferença significativa entre as médias do grupo de risco e do grupo dos pacientes com infarto. Comparando-se as médias obtidas para o grupo-controle e as médias dos grupos com infarto e com angina, nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 2).

Realizando a correlação de Pearson, os resultados de F1+2 correlacionaram inversamente com os resultados da proteína C ( $r = -0,716$ ;  $p < 0,05$ ) no grupo infarto. Os demais grupos não apresentaram correlação significativa, quando investigados.



**FIG. 1 - Resultados das determinações dos níveis plasmáticos de F1+2 nos grupos estudados. As barras horizontais representam os valores médios encontrados para cada grupo (n = número de amostras). Nenhuma diferença foi encontrada entre as médias dos quatro grupos.**



**FIG. 2 - Resultados das determinações das atividades da Proteína C nos grupos estudados (n = número de amostras). As barras horizontais indicam os valores médios obtidos para cada grupo. (\*) indica diferença significativa entre o grupo de risco e o grupo com infarto ( $p < 0,05$ ).**

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado um parâmetro hemostático que investiga o grau de hipercoagulabilidade em situações clínicas nas quais ocorre uma exacerbação da ativação do mecanismo da coagulação. A composição dos grupos de pacientes estudados (pacientes com fatores de risco, com angina ou com infarto) foi feita objetivando investigar o grau de ativação do sistema hemostático em uma escala crescente de manifestação de sintomas clínicos. Uma análise global dos dados apresentados na Tabela I permite concluir que nas doenças coronarianas, notadamente em pacientes com angina ou infarto, há uma tendência a uma maior ativação do mecanismo da coagulação. Níveis mais elevados de F1+2 e a redução de PCA nesses pacientes comparando-se com os grupos controle e de risco, sugerem que o mecanismo da coagulação está ativado, o que predispõe a formação de trombo.

O fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) foi determinado com o objetivo de se avaliar a ativação da cascata da coagulação nos grupos estudados. Nenhuma diferença foi encontrada entre os quatro grupos. Apesar de não haver diferença significativa, pode-se observar uma tendência à elevação dos níveis plasmáticos de F1+2 nos indivíduos do grupo de risco, angina e infarto quando comparados ao grupo-controle. Esta tendência à elevação se deve a um estado de hipercoagulabilidade resultante de diversos estímulos representados por importantes fatores de risco e/ou derivados do processo aterogênico encontrado naqueles indivíduos, bem como a redução da PCA nos pacientes infartados.

Quanto ao perfil observado para o F1+2 (Figura 1), a tendência ao aumento da média do grupo de risco quando comparada à média do grupo-controle poderia ser devido principalmente à ativação do mecanismo hemostático desencadeado por vários fatores de risco tais como hipertensão, hipercolesterolemia e tabagismo<sup>16</sup>. Cumpre assinalar que esses fatores de risco parecem não promover uma lesão endotelial significativa nos indivíduos ainda assintomáticos para a doença cardiovascular<sup>17</sup>. A tendência à diminuição da média para os pacientes com angina seria explicada pelo consumo dos fatores da coagulação, e a tendência à elevação na média do grupo infarto coincidiria com a ruptura da placa aterosclerótica que apresenta ação extremamente trombogênica. No entanto, novos estudos envolvendo mais pacientes tornam-se necessários para se determinar a expressão do F1+2 nessas situações clínicas, nas quais o mecanismo hemostático se encontra perigosamente ativado.

Com o objetivo de se avaliar o mecanismo da anticoagulação foi determinada a atividade da proteína C ativada (PCA) nos indivíduos estudados (Figura 2). Comparando-se as médias dos grupos de risco, angina e infarto com o grupo-controle, nenhuma diferença foi encontrada, apesar de ser observada uma tendência à ativação da PC nos indivíduos com fatores de risco. Esta discreta ativação da PC poderia ser explicada por um mecanismo de controle para compensar

o aumento da coagulação sanguínea encontrada nesses indivíduos. Comparando-se as médias de PCA no grupo de risco com o grupo de indivíduos infartados, pode-se observar uma diminuição significativa na média desse último. Esse fato pode ser justificado pela lesão endotelial presente nos pacientes com angina e com infarto, o que comprometeria a ativação da PC, considerando que a integridade endotelial é extremamente importante para a competência do sistema da anticoagulação natural.

Segundo Coelho em 1999<sup>17</sup>, em um estudo paralelo ao presente trabalho, onde foram empregados marcadores de lesão vascular e de ativação plaquetária, estes mesmos pacientes apresentaram níveis aumentados de trombomodulina plasmática. Sabe-se que a trombomodulina plasmática se apresenta menos funcional que a trombomodulina endotelial, e que isso leva à uma diminuição na formação do complexo trombomodulina-trombina e, portanto, à uma diminuição da ativação da PC<sup>17</sup>. Considerando que a trombomodulina é um marcador de lesão endotelial e que seus níveis plasmáticos estavam elevados nos mesmos pacientes estudados indicando a presença de lesão endotelial, é plenamente justificável o encontro de níveis reduzidos de PCA em infartados. Nesses pacientes, o achado de níveis elevados de trombomodulina plasmática, indicativo de lesão endotelial, comprometeria a eficiência do sistema de anticoagulação natural, considerando que o mesmo depende da integridade do endotélio no qual se encontra a trombomodulina funcional. No caso de pacientes com fatores de risco, já existe uma tendência à ativação do mecanismo hemostático, porém parece não haver ainda uma lesão endotelial expressiva, o que pode ser confirmado por dados previamente relatados na literatura<sup>17</sup>. Dessa forma, justificam-se os níveis não reduzidos de PCA observados para o grupo de risco no presente trabalho, já que parece ocorrer redução dessa proteína prioritariamente em pacientes com lesão vascular. Contrariamente, a tendência à redução dos níveis de PCA em relação aos grupos de risco e controle possivelmente reflete a presença de dano vascular nos pacientes com doença coronariana.

Uma correlação importante foi observada, cuja interpretação reafirma a idéia inicial de que em doenças cardiovasculares há uma importante participação do sistema hemostático, o qual se mostrou ativado nos grupos com angina e com infarto. No grupo com infarto, pode-se sugerir que existe um estado de hipercoagulabilidade demonstrado principalmente pelo comprometimento do mecanismo da anticoagulação natural, o que pode ser confirmado pela correlação negativa observada entre o F1+2 x PCA ( $r = -0,716$ ;  $p < 0,05$ ).

Por fim, podemos concluir que uma visão global dos dados do presente trabalho, permite inferir que a formação de fibrina nos indivíduos com doenças coronarianas provavelmente resultaria da ativação do mecanismo da coagulação e do comprometimento do mecanismo da anticoagulação o que favoreceria a manutenção de quantidades crescentes de fibrina.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEMIG e Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG pelo apoio financeiro e à toda equipe do Pronto Atendimento da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte pela cuidadosa seleção dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

1. **Jobe, M. I.** Mechanisms of coagulation and fibrinolysis. In: **Lotspeich - Steining, C. A.; Stiene-Martin, E. A.; Koepke, J. A. (Ed.).** *Clinical hematology: principles procedures correlations*. London: J. B. Lippincott. p.579-598, 1992.
2. **Dahlback, B.** Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood*. v. 85, p.607-614, 1995a.
3. **Janssen, M. C. H.; Verbruggen, H.; Wollersheim, H.; Hoogkamer, B.; Van Langen, H.** D-dimer determination to assess regression of deep venous thrombosis. *Thromb. Haemostas.* v.78, p.799-802, 1997.
4. **Koster, T.; Rosendaal, F. R.; De Ronde, H.; Briët, E.; Vandenbroucke J. P.; Bertina, R. M.** Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet*, v.342, p.1503-1505, 1993.
5. **Dahlback, B.** The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb. Res.* v.77, p.1-43, 1995b.
6. **Rugman, F. P.; Jenkins, J. A.; Duguid, J. K.; Bolton Maggs, P.; Hay, C. R. M.** Prothrombin fragment F1+2: correlations with cardiovascular risk factors. *Blood Coag. Fibrinol.* v.5, p.335-340, 1994.
7. **Mannucci, P. M.; Tripodi, A.; Bottasso, B.; Baudo, F.; Finazzi, G.; DeStefano, V.; Palareti, G.; Manotti, C.; Mazzucconi, M. G.; Castaman, G.** Markers of procoagulant imbalance in patients with inherited thrombophilic syndromes. *Thromb. Haemostas.* v.67, p.200-202, 1992.
8. **Merlini, P. A.; Bauer, K. A.; Oltrona, L.; Ardissino, D.; Cattaneo, M.; Belli, C.; Mannucci, P. M.; Rosenberg, R. D.** Persistent activation of coagulation mechanism in angina and myocardial infarction. *Circulation*. v.90, p.61-68, 1994.
9. **Bauer, K.; Rosenberg, R.** The pathophysiology of the prethrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of haemostatic system activation. *Blood*. v.70, p.343-350, 1987.
10. **Zoller, B.; Holm, J.; Svensson, P.; Dalback, B.** Elevated levels of prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma from patients with heterozygous Arg<sup>506</sup> to Gln mutation in the factor V gene (APC - resistance) and/or inherited protein S deficiency. *Thromb. Haemostas.* v.75, p.270-274, 1996.
11. **Leroy-Matheron, C.; Gouault-Heilmann, M.; Levent, M.** Prothrombin fragment F1 + 2 in patients with inherited deficiency in coagulation inhibitors. *Thromb. Haemostas.* v.64, p.1208-1210, 1991.
12. **McGehee, W. C.; Francis, R. B.; Patch, M. J.** Prothrombin fragment F1 + 2 in patients with venous thromboembolism. *Blood*. v.76, p.515-521, 1990.
13. **Bauer, K. A.; Weiss, L. M.; Sparrow, D.; Vokonas, P. S.; Rosenberg, R. D.** Aging-associated changes in indices of thrombin generation and protein C activation in humans. *J. Clin. Invest.* v.80, p.1527-1534, 1987.
14. **De Stefano, V.; Finazzi, G.; Mannucci, P. M.** Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood*. v.87, p.3531-3544, 1996.
15. **Bauer, K. A.** Natural anticoagulants and the prethrombotic state. In: **Handin, R. I.; Lux, S. E.; Stossel, T. P. (Ed.)** *Blood: principles e practice of hematology*. Philadelphia: J. B. Lippincott. p.1319-1339, 1995.
16. **Siscovick, D. S.; Schwartz, S. M.; Rosendaal, F. R.; Psaty, B. M.** Thrombosis in the young: effects of atherosclerotic risk factors on the risk of myocardial infarction associated with prothrombotic factors. *Thromb. Haemostas.* v.78, p.7-12, 1997.
17. **Coelho, E. A. F.** *Avaliação dos vasos, da agregação plaquetária e de outros parâmetros hemostáticos em pacientes com doenças cardiovasculares*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 119p. 1999.

Endereço para correspondência:  
Profª Maria das Graças Carvalho  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia da UFMG  
Av. Olegário Maciel, 2.360, Lourdes  
Belo Horizonte, MG - 30140-110  
E-mail: pswanner@bhlink.com.br

## Título de Especialista em Análises Clínicas pela SBAC

*Saiba o que é preciso para ter o seu*

As provas para a concessão do Título de Especialista em Análises Clínicas, outorgado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, são aplicadas durante a realização dos congressos ou quando programadas pelas regionais e delegacias da SBAC.

Conheça as normas do regulamento para a concessão desse título, através do telefone (0xx21)2264-4449, pelo fax (0xx21)2204-0245 ou pelo e-mail: [teac@sbac.org.br](mailto:teac@sbac.org.br)

# Doseamento de ácido hipúrico na urina de sapateiros de Porto Alegre e da Grande Porto Alegre

## Hipuric acid dosing in the urine of the shoemaker from Porto Alegre and the neighborhood

Simone Bardini<sup>1</sup>; Aletéia S. Alano<sup>1</sup>; Renata Limberger<sup>1</sup>; Ana Lúcia Xavier<sup>1</sup> & Vera M. Steffen<sup>1</sup>

**RESUMO** – Este trabalho tem como objetivo fazer um estudo de toxicologia ocupacional, verificando se os sapateiros que ficam expostos ao tolueno (que é o solvente da cola) têm o ácido hipúrico (que é um metabólito do tolueno) aumentado. Para isto, foi realizado monitoramento biológico fazendo-se doseamento do ácido hipúrico, por cromatografia gasosa, na urina e foi aplicado um questionário para obter-se informações relevantes para o trabalho. Este estudo foi realizado com sapateiros de Porto Alegre e da grande Porto Alegre. Analisando os resultados obtidos, concluímos que os níveis de ácido hipúrico ficaram dentro dos valores de IBMP (índice biológico máximo permitido).

**PALAVRAS-CHAVE** – Tolueno, toxicologia ocupacional, ácido hipúrico, monitoramento biológico, sapateiros.

**SUMMARY** – This work has as objective to do a study of occupational toxicology, observing if the shoemakers that get exposure to the toluene (that is the glue solvent) has the hippuric acid (that is the toluene metabolic) increased. For that, was realized a biologic marker dosing the hippuric acid by gas chromatography in the urine and was applied a questionnaire to obtain relevant informations for the study. This study was made with shoemakers from Porto Alegre. Analysing the results obtained, we concluded that the levels of hippuric acid were accepted by the IBMP values (maximum biologic level permitted).

**KEYWORDS** – Toluene, hippuric acid, biological monitoring, shoemakers, occupational toxicology.

### INTRODUÇÃO

O ambiente de trabalho é o local onde o trabalhador passa grande parte de seu tempo. Este ambiente deve ser adequado, ou seja, causar o menor prejuízo à saúde. É necessário obter o máximo de informações sobre as substâncias químicas, a sua manipulação nesses locais e o que as mesmas podem causar no organismo.

A toxicologia ocupacional estuda os efeitos nocivos sobre o homem, de substâncias químicas utilizadas ou produzidas em processos industriais<sup>12</sup>. Trata da identificação, análise, mecanismo de ação, biotransformação e interação das substâncias químicas industriais, além do diagnóstico das intoxicações, tratamento e prevenção dos seus efeitos tóxicos<sup>11</sup>.

É sabido que os sapateiros manipulam colas a base de solvente (tolueno). O tolueno é um hidrocarboneto aromático que possui grau de insalubridade médio (NR-15) e grau de risco à saúde moderado à exposição crônica e leve à exposição aguda<sup>5</sup>. A sua pressão parcial e a densidade do vapor em relação ao ar levam-no a ser um solvente com alta volatilidade e os seus vapores a permanecerem em baixas alturas, o que aumenta a disponibilidade para a via respiratória<sup>5</sup>. É lipossolúvel e atravessa a barreira hematoencefálica com facilidade, produzindo uma alteração no estado de consciência, similar aos níveis mais leves de anestesia<sup>9,7</sup>. Na exposição aguda age como depressor do sistema nervoso central causando fadiga, dor de cabeça,

confusão, tontura e incoordenação motora. Antes da depressão pode ocorrer excitação do sistema nervoso central, com euforia, tremor e nervosismo<sup>7,9,11</sup>. No aparelho cardiovascular, o tolueno provoca arritmias, infarto do miocárdio e morte súbita<sup>1,2,10,11</sup>. Na exposição crônica, foram observados distúrbios neuropsíquicos como depressão, confusão mental, encefalopatia progressiva e irreversível acompanhada de atrofia cerebral e cerebelar, distúrbios cognitivos, reflexos hiperativos, neuropatia periférica, tremores, dor de cabeça recorrente, perda da memória visual e verbal, disfunção do hipotálamo, epilepsia, tendências suicidas, síndromes orgânicas afetivas e, mais raramente, psicose<sup>8,13</sup>. O tolueno pode produzir, também, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade<sup>14</sup>. A principal via de introdução é o sistema respiratório, sendo sua absorção pulmonar (na forma de vapor) estimada em 40 a 50% da concentração inalada<sup>10</sup>.

Do tolueno absorvido, aproximadamente 80% sofre biotransformação a nível dos microsomas hepáticos (citocromo P<sub>450</sub>). O principal metabólito formado é o ácido benzóico que, conjugado com a glicina (cerca de 80%), forma o ácido hipúrico e, com ácido glicurônico, produz benzoilglicuronídeo (cerca de 20%). Outra via de biotransformação é a formação de orto, meta e para cresóis, cuja importância quantitativa é bem menos significativa (menos de 1%)<sup>14</sup>. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR – MT/BR)<sup>12</sup> estabelece parâmetros para o monitoramento biológico da exposição ocupacional aos agentes químicos. O ácido hi-

Recebido em 14/5/2002

Aprovado em 8/7/2002

<sup>1</sup>Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

púrico é o bioindicador urinário para o tolueno sendo, 1,5 g/g de creatinina o valor de referência e 2,5 g/g de creatinina o IBMP (índice biológico máximo permitido)<sup>4</sup>. O ácido hipúrico é um componente normal da urina, sendo suas concentrações influenciadas por fatores tais como diurese, alimentos e medicação<sup>11</sup>. Além destes, as características individuais como sexo, idade, raça e estado nutricional podem diversificar a resposta de cada organismo frente à exposição à mesma concentração de um xenobiótico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os sapateiros foram submetidos a uma entrevista composta de 18 questões referentes à história clínica, ocupacional, cuidados no trabalho e qualidade de vida. Esses trabalhadores foram esclarecidos quanto aos objetivos e benefícios deste trabalho e assinaram um termo de consentimento informado. O grupo estudado apresenta, pelo menos, cinco anos de exposição a solventes.

### Procedimento analítico

As amostras foram preparadas conforme o método sugerido por Roosmalen e Drummond (1978)<sup>15</sup>, sendo as condições cromatográficas modificadas pelo CIT-RS. Para cálculo da concentração de ácido hipúrico utilizou-se as concentrações de creatinina na urina, conforme estabelece a NR 7-MT/BR<sup>3</sup>.

### Amostragem

As amostras de urina, para análise de ácido hipúrico, foram coletadas no início e final da jornada de trabalho.

### Estabilidade

O ácido hipúrico é estável na urina por um dia à temperatura ambiente (20-23°C) e por duas semanas se a amostra for congelada.

### Armazenamento

As amostras de urina foram mantidas sob refrigeração a 4°C até seu processamento analítico, após este processamento, as amostras foram armazenadas em freezer à -20°C até a hora de injetá-las no cromatógrafo a gás. Este armazenamento não deve ultrapassar mais de 72 horas.

### Condições cromatográficas

Fluxo do gás de arraste (He) 1,0 ml/min.; temperatura do injetor e do detector 220°C e programação de temperatura da coluna: inicial de 140°C por 3,5 min.; rampa de 50°C/min. até 190°C, manutenção por 1,0 min.; rampa de 50°C/min. até 200°C, manutenção por 1,0 min.; injetor capilar na função "Split", com razão 1:50.

## RESULTADOS

- 95,2% dos trabalhadores são homens;
- 19% dos trabalhadores são fumantes;
- 42,8% dos trabalhadores tomam café;
- 28,6% dos trabalhadores sentem dor de cabeça, tonturas e/ou náuseas;
- 14,4% dos trabalhadores apresentam problemas de saúde como diabetes, hepatite C ou problemas respiratórios;
- A idade mínima dos trabalhadores é 15 anos e a máxima é 71 anos;

- 28,5% dos trabalhadores ficam expostos 2 horas/dia ao tolueno e 71,5% ficam 8 horas/dia;
- Nenhum dos trabalhadores apresentou níveis de ácido hipúrico acima do IBMP (índice biológico máximo permitido);
- 14,3%, em média, dos trabalhadores ficaram com níveis de ácido hipúrico acima do valor de referência (1,5g/g de creatinina);
- Dos trabalhadores que ficaram com os níveis de ácido hipúrico acima do valor de referência, todos ficam expostos ao tolueno 8 horas por dia;
- A média do ácido hipúrico ficou em 0,6099 g de ácido hipúrico/g de creatinina.

## DISCUSSÃO

Analisando o perfil do grupo estudado foi observado que é composto, em sua maioria, por trabalhadores de meia idade (49,8 anos, em média), com exposição de 26,2 anos, em média, a solventes. No histórico de exposição anterior foi verificado que nenhum destes trabalhadores estavam expostos a solventes e nem possuíam atividades extra ocupacionais com exposição ao tolueno. Dos medicamentos utilizados pelos trabalhadores, não há, na literatura, relatos de que possam interferir nos níveis de ácido hipúrico.

Pelos valores de ácido hipúrico obtidos no monitoramento biológico dos sapateiros, todos encontram-se dentro do IBMP (índice biológico máximo permitido). Porém, julgamos necessária uma maior amostragem para obtermos resultados estatisticamente significativos. Além disto, julgamos conveniente continuar o monitoramento dos trabalhadores que obtiveram concentrações de ácido hipúrico acima dos valores de referência.

## REFERÊNCIAS

1. Almeida, V. M. O.; Lucas, A. C. S.; Galvão, J. F. Determinação de ácido hipúrico em urina de adolescentes que inalam cola de sapateiro. *Revista U<sup>B</sup> Série: Ciências da saúde*. v.2, n.1-2, p.47-62, Jan./Dez. 1993.
2. Andrade, A.; Campolina, D.; Dias, M. B. *Toxicologia na prática clínica*. Belo Horizonte. Ed. Folium, 2001.
3. Associação Brasileira para Prevenção de Acidentes. NR-7-Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional. In: *Legislação de Segurança e Medicina do Trabalho*. Rio de Janeiro: ABPA, 1996.
4. Associação Brasileira para Prevenção de Acidentes. NR-15. In: *Legislação de Segurança e Medicina do Trabalho*. Rio de Janeiro: ABPA, 1996.
5. Casarett and Doull's. *Toxicology, the basic science of poisons*. USA. McGraw-Hill.
6. Flanagan, R. J.; Braithwaite, R. A.; Brown, S. S.; Widdop, B.; Wolff, F. A. *Basic analytical toxicology*. World Health Organization, Geneva, 1995.
7. Forster, L. M. K.; Tanhauser, M.; Tanhauser, S. L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. *Revista de Saúde Pública*, 28(2):167-72, 1994.
8. Goes, R. C. *Toxicologia industrial*. Rio de Janeiro. Ed. Revinter, 1997.
9. Greenberg, M. I.; Hamilton, R. J.; Philips, S. D. (Ed). *Occupational, industrial, and environmental toxicology*. St. Louis: Mosby-Year Book. 1<sup>st</sup> ed. 1996.
10. Larini, L. *Toxicologia*. São Paulo: Editora Manole Ltda. 3<sup>a</sup> ed. p.301, 1997.
11. Lauwerys, R. R. *Toxicologia industrial e intoxicaciones profesionales*. Barcelona: Ed. Masson S.A., 1994.
12. Oga, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu Editora de São Paulo. 1<sup>a</sup> ed. p.515, 1996.
13. Pedrozo, M. F. M.; Siqueira, M. E. P. B. Solventes de cola: abuso e efeitos nocivos à saúde. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 23(4):336-40, 1989.
14. Seibt, L. T. *Exposição ocupacional a agentes químicos e físicos*. Trabalho de conclusão da disciplina de estágio curricular em farmácia. Orientadora: Dr<sup>a</sup> Vera M. Steffen. Julho 1999.
15. Van Roosmalen, P.; Drummond, I. Simultaneous determination by gas chromatography of the major metabolites in urine of toluene, xylene and styrene. *British Journal of Industrial Medicine*, v.35, p.56-60, 1978.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr<sup>a</sup> Vera Maria Steffen  
Av. Ipiranga, 2752, Sala 604 - 90610-000 - Porto Alegre, RS  
Tel. (0xx51)3316-5297  
E-mail: vsteffen@terra.com.br

# Otimização da técnica de Citometria de Fluxo para análise do fator tissular em monócitos de sangue periférico\*

## Flow Cytometric assay optimization for peripheral blood monocyte tissue factor analysis

Lauro Mello Vieira<sup>1</sup>; Luci Maria Sant'Ana Dusse<sup>2</sup>; Olindo Assis Martins Filho<sup>2</sup> & Maria das Graças Carvalho<sup>1</sup>

**RESUMO** – A citometria de fluxo permite a análise de células, individualmente, através de um fluxo laminar. Esta metodologia tem sido largamente utilizada, principalmente na área de oncohematologia e dos transplantes de medula óssea. A possibilidade de se utilizar dois ou mais anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos diferentes permite o estudo em uma determinada população celular de substâncias procoagulantes produzidas por células envolvidas nos mecanismos da hemostasia, abrindo-se a possibilidade de aplicação desta metodologia em áreas de estudo da fisiopatologia relacionada aos estados de hipercoagulabilidade. Os monócitos estão altamente envolvidos nos processos fisiopatológicos envolvendo a formação de trombo e placas ateromatosas e o Fator Tissular (FT) consiste no principal ativador fisiológico do sistema de coagulação sanguínea. Neste trabalho buscou-se otimizar as condições de determinação da expressão de FT em monócitos por citometria de fluxo, a partir de metodologia já descrita, em duas populações de indivíduos saudáveis, com faixa etária diferentes, no sentido de se estabelecer os níveis de expressão de FT. Para a análise dos resultados foram utilizadas duas metodologias que definem o percentual de células expressando FT. Dos resultados obtidos, pode-se concluir que não há diferença significativa na expressão de FT de monócitos em função da idade e que os dois métodos de análise utilizados não diferem entre si.

**PALAVRAS-CHAVE** – Fator tissular de monócitos; citometria de fluxo; otimização.

**SUMMARY** – The flow cytometric assay allows to separate a particular cell population even if it is present in a heterogeneous cell samples. It has been applied to oncohematology and bone marrow transplantation studies. Two associated fluorescent markers allow to study in a particular cell population the expression of procoagulant substances produced by cells involved in hemostasis mechanisms. This methodology application opens the perspective of pathophysiologic studies related to hypercoagulability states. Considering that monocytes are highly involved in pathophysiologic mechanisms contributing for thrombus formation and atheromatous plaques and that Tissue Factor (FT) represents the principal physiologic activator of the clotting system, this study constitutes a potential tool for obtaining new insights on the role of the monocytes in diseases associated to the hypercoagulability states. At the present work, it was aimed to establish the optimization conditions for measuring the monocyte tissue factor (MTF) expression by flow cytometric assay based on a previous methodology. Blood samples were collected from healthy subjects divided in two age ranges. Studies on MTF were carried out comparing two methods of analysis which define the percentage of cells expressing FT on their surface. From the results, it was concluded that there is no difference between the two age ranges related to MTF expression. In addition, the two assessed methods for analysis did not differ between themselves.

**KEYWORDS** – Monocytes tissue factor; flow cytometry; optimization.

## INTRODUÇÃO

O fator tissular (FT) é considerado o principal ativador fisiológico do sistema da coagulação sanguínea, através da ativação do fator VII. O complexo bimolecular FT/VIIa, por proteólise limitada, ativa os fatores X e IX da coagulação a fatores Xa e IXa, iniciando o processo que culmina com a formação da fibrina<sup>8</sup>.

Vários trabalhos têm demonstrado o aumento da concentração plasmática de FT livre em situações clínicas decorrentes de estados de hipercoagulabilidade<sup>2,3</sup>.

Monócitos de sangue periférico são células com alta capacidade de migração para o espaço extravascular. Além de serem capazes de carrear moléculas de LDL parcialmente oxidadas, em seu citoplasma, estas célu-

las apresentam como glicoproteína de transmembrana, quantidades detectáveis de FT. Isto faz com que os monócitos estejam altamente comprometidos nos fenômenos que envolvem a formação de placas ateromatosas e trombos intravasculares nas situações clínicas que culminam com trombose arterial ou trombozes venosas<sup>4,5</sup>.

Uma expressão aumentada de FT *in vivo* é a principal causa de risco em doenças trombóticas, como a formação de trombos após ruptura de placa aterosclerótica, levando a infarto do miocárdio e coagulação intravascular associada com câncer e choque séptico<sup>6</sup>.

A citometria de fluxo permite a análise através de um fluxo laminar, de um número significativo de células, individualmente e em um tempo relativamente curto<sup>7</sup>. A marcação prévia de células com anticorpos

Recebido em 7/5/2002  
Aprovado em 12/6/2002

<sup>1</sup>Prof. Adjunto Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG – Belo Horizonte MG;

<sup>2</sup>Pesquisador Associado do Instituto de Pesquisas René Rachou – Fiocruz – Belo Horizonte MG;

\*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG e Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas René Rachou – Fiocruz – Belo Horizonte MG. Trabalho financiado em parte pela FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (CDS 1203/97) e CNPq – Conselho Nacional de Pesquisas.

monoclonais marcados com fluorocromos permite a análise de um tipo celular com uma determinada característica física e/ou química mesmo em amostras heterogêneas de células.

Isto tem possibilitado o emprego desta metodologia em várias áreas da hematologia, notadamente na oncohematologia, na caracterização de marcadores relacionados a processos leucêmicos, em condições de diagnóstico, prognóstico e monitoração terapêutica, nos transplantes de medula óssea, principalmente na avaliação do conteúdo de células tronco e outras áreas. Estudos na área de investigação de condições de hipercoagulabilidade podem se valer desta metodologia no sentido de se estabelecer níveis de substâncias com caráter procoagulante ou anticoagulante envolvidos na fisiopatologia dos processos trombóticos.

Neste trabalho, buscou-se otimizar uma técnica para a determinação da expressão de FT em monócitos, a partir de amostras de sangue total, estimuladas ou não com endotoxina de *Escherichia coli* (LPS), em indivíduos saudáveis, em duas faixas etárias diferentes, no sentido de se estabelecer os níveis basais e estimulados nestas duas populações. Desta maneira, conhecendo-se os aspectos fisiológicos deste marcador pode-se vislumbrar a perspectiva de se definir, em pacientes com maior expressão de FT em monócitos, prognóstico sobre o risco potencial trombótico.

A análise da expressão de FT em monócitos foi realizada comparando-se dois métodos de quantificação: a porcentagem de células monócíticas positivas para FT, analisadas por histograma e a porcentagem de células positivas, analisadas por estatística de quadrante.

## MATERIAL E MÉTODO

### Casuística

A população de indivíduos utilizada no presente trabalho foi constituída de voluntários, divididos em duas faixas etárias (de 20 a 39 e de 40 a 67 anos de idade), que não apresentavam fatores de risco para trombose como: hipertensão, diabetes, tabagismo ou obesidade e não faziam uso de qualquer tipo de medicamento, notadamente, AAS, antiagregantes plaquetários, anticoagulantes, contraceptivos orais, hormônios, antihipertensivos e diuréticos. Estes indivíduos não apresentavam história prévia nem evidência de trombose de membros inferiores, avaliada pelo Duplex Scan.

Este trabalho mereceu parecer favorável da Comissão de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. As amostras foram coletadas após os indivíduos serem esclarecidos dos objetivos do presente trabalho e assinarem o termo de consentimento pós-informado.

### Amostra

Foram colhidas amostras de 5 mL de sangue venoso utilizando-se tubos e agulhas do sistema Vacutainer (Becton-Dickinson- Mountain View, CA, USA), contendo citrato de sódio como anticoagulante. As amostras foram processadas até um tempo máximo de 1 hora após a coleta.

### Reagentes

#### • Solução salina tamponada pH 7,2 (PBS)

Dissolver 2,65g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,36g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 8,18g de NaCl em 1.000 mL de água destilada.

#### • Solução de lise

Solução de Brand Facs Lysing Solution (Becton-Dickinson- Mountain View, CA, USA) diluída a 1/10, com água destilada, antes do uso.

#### • Solução estabilizadora

Paraformaldeído a 10 g/L em cacodilato de sódio a 10,2 g/L e NaCl a 6,63 g/L. O pH da solução foi ajustado para 7,2.

#### • Anticorpo monoclonal murino anti CD14 humano marcado com ficoreritrina

Anti-CD14<sup>PE</sup> humano, mouse (Leu-M3) (Becton-Dickinson- Mountain View, CA, USA).

#### • Anticorpo monoclonal murino anti-fator tissular humano marcado com isotiocianato de fluoresceína

Mab against human tissue factor FITC conjugated (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT - USA).

#### • IgG1 de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína

IgG1 mouse FITC conjugated (Becton-Dickinson- Mountain View, CA, USA).

#### • Lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS)

Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* serotypo 0111:B4 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO - USA).

## MÉTODOS

### Determinação da expressão de FT em monócitos de sangue periférico

Utilizando a citometria de fluxo, foi determinada a expressão de FT em monócitos a partir de amostras de sangue periférico, através da marcação simultânea destas células com dois anticorpos monoclonais: um anticorpo anti-CD14 humano marcado com ficoreritrina (PE) e outro anti-fator tissular humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

A otimização da metodologia para a determinação da expressão de FT foi baseada na técnica descrita por Amirkhosravi<sup>1</sup>, com modificações. As principais modificações consistiram na mudança no tempo de incubação da amostra com LPS a 37°C, que foi de 4 horas, no volume de anti-CD14<sup>PE</sup> adicionado (4 µL/0,1 mL de amostra), na solução de lise (Brand Facs Lysing Solution) e na solução estabilizadora (paraformaldeído/cacodilato). Foram feitas cinco preparações para cada indivíduo:

#### T1 - Tubo controle para a expressão de FT basal

A uma amostra de 0,1 mL de sangue total, em citrato de sódio, foram adicionados 10 µL de IgG1 de camundongo marcado com fluoresceína (IgG1<sup>FITC</sup> mouse) e 4 µL de anticorpo anti CD14 humano marcado com ficoreritrina (anti-CD14<sup>PE</sup>).

#### T2 - Tubo para a determinação de FT basal

A uma amostra de 0,1 mL de sangue total, em citrato de sódio, foram adicionados 10 µL de anticorpo anti fator tissular humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (anti-FT<sup>FITC</sup>) e 4 mL de anti-CD14<sup>PE</sup>.

#### T3 - Tubo controle para a determinação da expressão de FT após incubação

Uma amostra de 1,0 mL do sangue total, em citrato de sódio, foi incubada a 37°C por 4 horas. Após este tempo, foram adicionados à uma alíquota de 0,1 mL, 10 µL de IgG1<sup>FITC</sup> e 4 µL de anti-CD14<sup>PE</sup>.

#### T4 - Tubo para determinação da expressão de FT após incubação

Uma amostra de 1,0 mL do sangue total, em citrato

de sódio, foi incubada a 37°C por 4 horas. Após este tempo foram adicionados à uma alíquota de 0,1 mL, 10 µL de anti-FT<sup>FITC</sup> e 4 µL de anti-CD14<sup>PE</sup>.

#### **T5 - Tubo para a determinação da expressão de FT após incubação com LPS**

À uma amostra de 1,0 mL do sangue total, em citrato de sódio, foi adicionado LPS numa concentração final de 10 µg/mL. A mistura foi incubada a 37°C por 4 horas. Após este tempo foram adicionados a 0,1 mL da amostra, 10 µL de anti-FT<sup>FITC</sup> e 4 µL de anti-CD14<sup>PE</sup>.

Os tubos preparados imediatamente (T1 e T2) e as misturas preparadas após incubação de 4 horas a 37°C (tubos T3, T4 e T5), foram incubados a 4°C por 30 minutos, ao abrigo da luz. Após este tempo foi adicionado à cada tubo, 2,0 mL de solução de lise, sob agitação, por 15 segundos. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 10 minutos. Após este tempo as amostras foram centrifugadas a 1.200 G por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado por três vezes com solução de PBS. Após a última centrifugação o sedimento foi ressuspensão com 0,4 mL de solução estabilizadora e mantida a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento de ser lida.

#### **Leitura e análise da expressão de FT em monócitos de sangue periférico**

A determinação da expressão de FT em monócitos de sangue periférico foi feita em citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson- Mountain View, CA, USA), utilizando-se o "software" Cell Quest versão 3.3 (Becton-Dickinson- Mountain View, CA, USA) para aquisição e análise. O sistema foi calibrado para a avaliação de 3.000 células em cada determinação. A população de monócitos foi identificada pela fluorescência emitida pela ficoeritrina em 488 nm e o FT, expresso em monócitos, pela fluorescência emitida pelo isotiocianato de fluoresceína em 525 nm. O tubo controle para a expressão de FT basal (T1) foi utilizado para se determinar a posição do marcador (M1), excluindo-se um percentual em torno de 98 % de células apresentando fluorescência inespecífica (controle isotópico).

A análise da expressão de FT em monócitos foi feita através de dois parâmetros: a determinação da porcentagem de células monocíticas expressando FT, através da análise do histograma e a determinação da porcentagem através da estatística de quadrante.

#### **Parâmetros para definição da expressão de FT**

Quatro parâmetros foram determinados através das análises dos percentuais de fluorescência pelo histograma e pela estatística de quadrante, para cada indivíduo: a expressão de FT basal, a expressão de FT induzida pela incubação a 37°C, a expressão de FT estimulada por LPS e a determinação do FT total.

A determinação de FT basal foi obtida pela diferença das leituras dos tubos T2 e T1. A determinação da expressão de FT induzida pela incubação a 37°C foi obtida pela diferença entre os tubos T4 e T3. A expressão de FT induzida por LPS foi obtida através da diferença entre os valores obtidos para os tubos T5 e T4 e a expressão do FT total pela diferença entre as leituras dos tubos T5 e T3.

#### **Análise estatística**

Foi utilizado o teste de *t* (Student), após normalização dos dados (transformação logarítmica), para análise

de significância entre os dois grupos de indivíduos de diferentes faixas etárias, em um nível de significância de 0,05. Utilizou-se o software Excel 2000 (Microsoft Corporation – USA).

## **RESULTADOS**

### **Otimização da metodologia para a determinação do FT em monócitos**

A incubação de amostras de sangue com LPS, em tempos variados, demonstrou que em um tempo de incubação de 4 horas ocorre expressão máxima de FT induzido por esta endotoxina. A incubação da amostra (0,1 mL de amostra de sangue total), com volumes variados de anti-CD14<sup>PE</sup> demonstrou que 4 mL deste reagente são suficientes para fornecer uma marcação adequada de monócitos. A solução de lise utilizada promoveu uma lise completa dos eritrócitos e após lavagem das células e estabilização forneceu um padrão de leitura com um nível reduzido de contaminação. A solução de paraformaldeído/cacodilato se mostrou adequada à estabilização do material, possibilitando uma leitura estável por um período de até 72 horas, após o término da preparação.

Na Fig. 1 é mostrado o resultado da análise pelo histograma para a preparação relativa ao tubo T1, de uma amostra de um dos indivíduos analisados (gráficos A, B e C). O Gráfico A é relativo a distribuição das células segundo os parâmetros granulocidade e tamanho das células, em escala arbitrária de 0 a 1.000. As células com padrão correspondente a monócitos constituem-se em uma amostra bastante homogênea.

No Gráfico B é mostrada a distribuição das células segundo os parâmetros granulocidade e marcação por anticorpo anti-CD14<sup>PE</sup>, distribuída em escala logarítmica arbitrária de  $10^0$  a  $10^4$ . O marcador R1 (gate) é utilizado para delimitar a população de monócitos a serem analisadas pelo histograma. A distribuição das células delimitadas pelo "gate" é mostrada no histograma do Gráfico C. O marcador é posicionado no sentido de se eliminar grande parte das células que apresentam marcação de baixa intensidade e inespecífica, para fluoresceína (98,32% das células). Com isto 1,68% das células são consideradas positivas para marcação com IgG1<sup>FITC</sup> de camundongo (controle isotópico).

A análise da preparação relativa ao tubo T5 para o mesmo indivíduo é mostrada nos Gráficos de D a F. No gráfico D as células estão distribuídas segundo os parâmetros de granulocidade e tamanho. Observa-se que após 4 horas de incubação a 37°C e estimulação com LPS a população de células anteriormente homogênea se torna heterogênea, pelo aumento de tamanho de parte das células. No Gráfico E a população de monócitos é delimitada pelo "gate" (R1), para análise pelo histograma (Gráfico F). A análise do histograma mostra um aumento do percentual de células marcadas com anticorpo antiFT<sup>FITC</sup> ao longo do eixo, na escala de  $10^0$  a  $10^4$ . Com o marcador definido no Gráfico C, a porcentagem de monócitos expressando FT é agora de 86,88%.

Na Fig. 2 observa-se o resultado da análise por estatística de quadrante. No Gráfico C as células estão distribuídas segundo os parâmetros antiCD14<sup>PE</sup> e IgG1<sup>FITC</sup>. Nestas condições 4 quadrantes são definidos através das barras horizontal e vertical. A barra vertical define um percentual de 1,52% de células (Q2), que são consideradas positivas para fluorescência de-

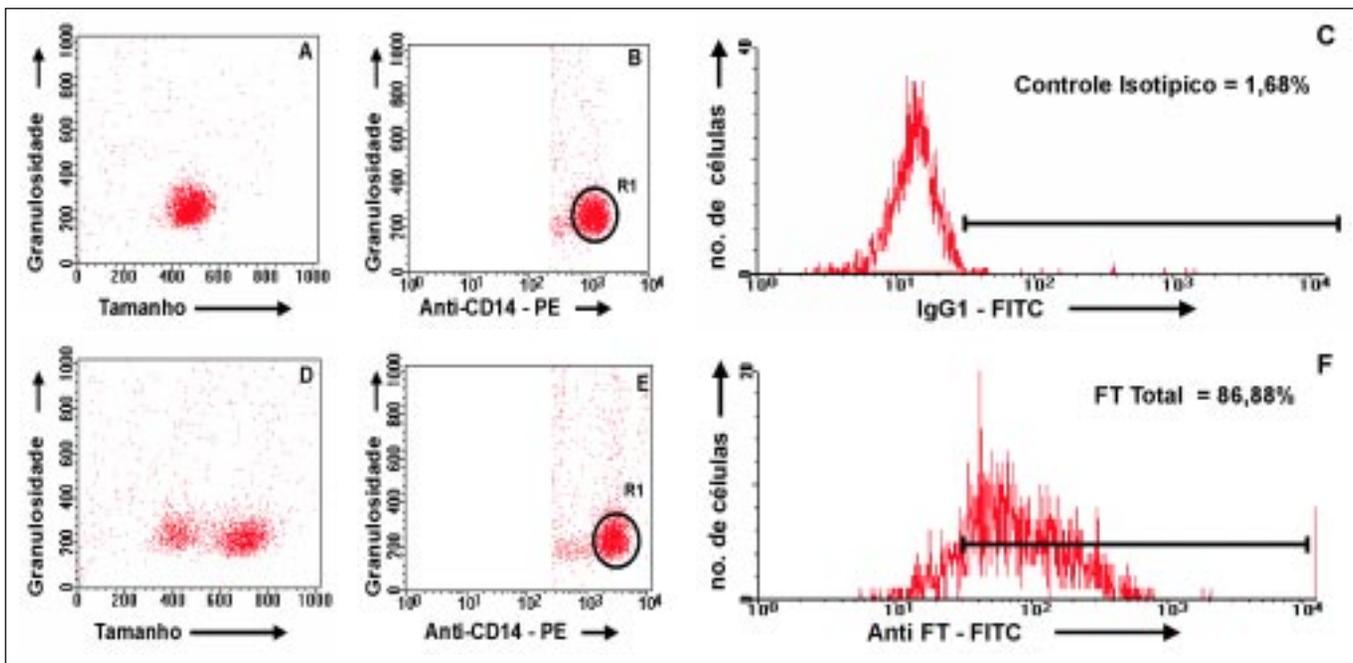


FIG. 1 - Análise por histograma da preparação controle isotipo para IgG1<sup>FITC</sup> de camundongo (T1) e FT total (T5), de um dos indivíduos analisados.

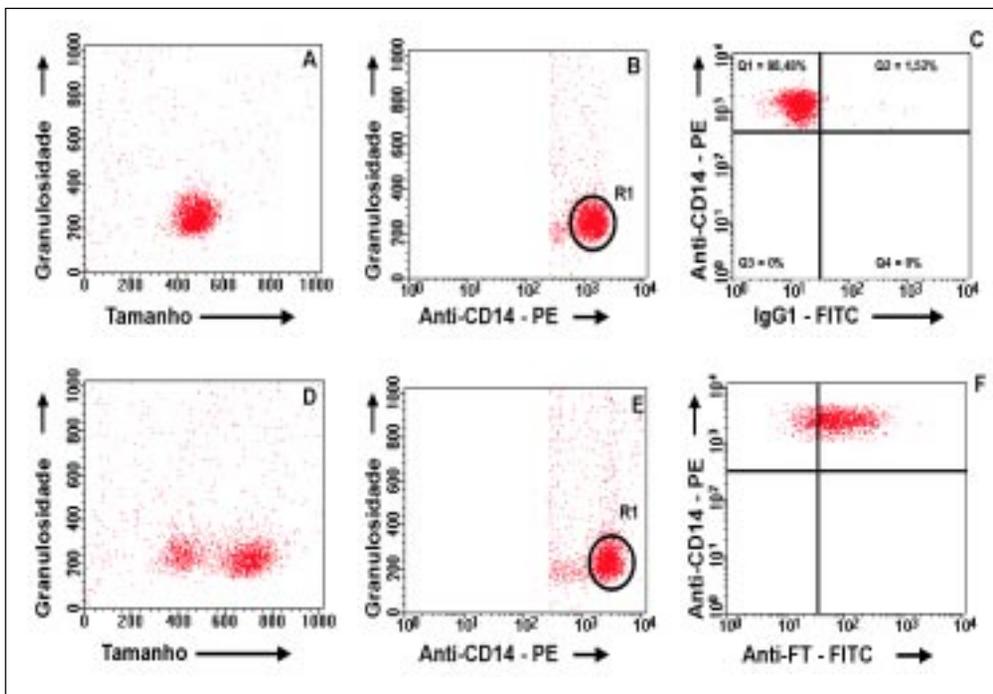


FIG. 2 - Análise por Estatística de Quadrante da preparação controle isotipo para IgG1<sup>FITC</sup> de camundongo (T1) e FT total (T5), do mesmo indivíduo analisado na figura anterior.

vido ao isotiocianato de fluoresceína. No quadrante Q1, 98,48% das células, apresentam fluorescência inespecífica pela adsorção de IgG1<sup>FITC</sup> (controle isotípico). No Gráfico F, com o marcador (barra vertical), na mesma posição definida no Gráfico C, observa-se um aumento do percentual de monócitos expressando FT (Q2=86,43%), enquanto que 13,57% das células, apresentam fluorescência considerada inespecífica (Q1).

#### Determinação da expressão de FT basal

Os resultados das determinações da expressão de FT basal nas duas populações de faixa etária diferentes, mostrou que os níveis de FT basal são reduzidos.

Comparando-se os dois métodos de análise pode-se observar que a análise pela estatística de quadrante, forneceu os valores mais baixos e o menor desvio padrão em torno da média (Tabela I). A análise de significância mostrou que não existe diferença significativa entre as duas populações e que o método de estatística de quadrante forneceu resultados mais homogêneos com um valor de *t* de 0,0568 para um valor de *t* crítico bimodal de 2,0244 (Tabela 2).

#### Determinação da expressão de FT após incubação a 37°C

A determinação da expressão de FT após incubação a 37°C forneceu os resultados médios apre-

sentados na Tabela I. A análise por estatística de quadrante forneceu resultados em porcentagem média, inferiores na população de menor faixa etária e mais altos na população de maior faixa etária, quando comparado com os resultados obtidos pelo histograma. Entretanto, não há diferença significativa entre as duas populações (Tabela II).

#### Determinação da expressão de FT após estimulação com LPS

Após incubação a 37°C, com LPS numa concentração final de 10 mg/mL, observa-se um aumento signifi-

**TABELA I**  
**Médias e desvios padrão das determinações em porcentagem de monócitos positivos para FT obtidas pelo histograma e pela estatística de quadrante nas duas populações de indivíduos saudáveis, de diferentes faixas etárias**

Parâmetros	Histograma		Estatística de quadrante	
	29,9 ± 6,3 anos	48,8 ± 6,5 anos	29,9 ± 6,3 anos	48,8 ± 6,5 anos
FT basal	2,1 ± 2,2 %	2,1 ± 2,7 %	1,2 ± 1,0 %	1,4 ± 1,2 %
FT 37°C	2,3 ± 2,5 %	2,8 ± 3,8 %	1,9 ± 1,7 %	3,3 ± 4,3 %
FT c/ LPS	25,1 ± 20,4 %	26,2 ± 24,9 %	20,6 ± 17,3 %	25,0 ± 24,0 %
FT total	27,4 ± 21,0 %	29,1 ± 24,5 %	22,5 ± 18,1 %	27,6 ± 23,5 %
n	21	19	21	19

O número de indivíduos de cada grupo é indicado na tabela (n).

ficativo da expressão de FT em monócitos, nas duas populações de indivíduos saudáveis. Quando se corrige a influência da temperatura, diminuindo-se o valor obtido pela indução pelo LPS por aquele obtido quando se submete uma amostra a 37°C, sem entretanto, adicionar-se LPS, os resultados demonstram que a análise da porcentagem de células positivas foi menor quando avaliada por estatística de quadrante do que quando avaliada por histograma, na população de faixa etária menor (Tabela I), entretanto, qualquer que seja o método utilizado, não há diferença significativa entre as duas populações (Tabela II).

#### Determinação da expressão de FT total

Os resultados obtidos de expressão máxima de FT, pelo efeito da temperatura de 37°C e pela indução pelo LPS são mostrados na Tabela I. Pode-se observar que a análise pelo histograma e pela estatística de quadrante, forneceram um valor médio discretamente inferior para o grupo de faixa etária mais baixa, entretanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de indivíduos (Tabela II).

### CONCLUSÕES

As novas condições de análise introduzidas na metodologia utilizada como referência, propiciaram uma otimização adequada, permitindo uma maior expressão de FT, pelo prolongamento do tempo de incubação e a obtenção de uma preparação estável e com pouca contaminação, como pode ser observado nas Figs. 1 e 2.

A expressão de FT basal forneceu resultados bastante reduzidos nos dois métodos utilizados sendo que a estatística de quadrante forneceu resultados mais homogêneos que a análise pelo histograma. O método de análise pela estatística de quadrante possibilita uma maior precisão no posicionamento do marcador, pelo observador, pela distribuição das células em duas dimensões, segundo dois parâmetros de fluorescência.

A incubação a 37°C por 4 horas, aumenta a expressão de FT na membrana dos monócitos, porém este aumento é pouco significativo na população de indivíduos saudáveis. Isto pode ser observado tanto quando a análise é feita pelo histograma quando pela estatística de quadrante.

A estimulação pelo LPS após a incubação a 37°C fornece resultados bem mais elevados do que aqueles obtidos com amostras não estimuladas por esta endotoxina. Os resultados médios obtidos variam de 10 a 20 vezes em relação ao valor de FT basal.

**TABELA II**  
**Análise de significância entre as duas populações de indivíduos analisados pelo histograma e pela estatística de quadrante, através do teste de t (Student), em um nível de significância de 0,05**

Parâmetros	Histograma	Estatística de quadrante
FT basal	0,5047	0,0568
FT 37°C	0,8212	-0,5865
FT c/ LPS	-0,1465	-0,6423
FT total	-0,2027	-0,67357
t crítico bi	2,0244	
gl	39	

Os resultados são expressos em logaritmos.

Quaisquer que sejam os parâmetros ou métodos de análise utilizados, os resultados demonstram que não há diferença significativa entre as duas populações de indivíduos estudados. Assim, a idade não parece ser um parâmetro importante no que diz respeito a expressão de FT basal ou estimulado por LPS. Não seria o FT em monócitos, o parâmetro de risco capaz de explicar uma maior prevalência de risco trombotico em função da idade.

Dessa forma, estudos posteriores comparando os níveis de FT de monócitos entre uma população sadia e outra após episódio trombotico, podem ser bastante promissores (ou elucidativos) no que diz respeito à contribuição do FT para desencadear o processo trombotico por si só, excluindo a idade como fator de risco.

### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo Correa de Oliveira pela disponibilização do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas René Rachou e ao Prof. Dr. Ivan Sampaio por sua colaboração na análise estatística.

### REFERÊNCIAS

- Amirkhosravi, A.; Alexander, M.; May, K.; Francis, D. A.; Warnes, G.; Biggerstaff, J.; Francis, J. L. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb. Haemost.* 75:87-95, 1996.
- Falciani, M.; Gori, A. M.; Fedi, S.; Chiarugi, L.; Simonetti, I.; Pabizzi, R. R.; Prisco, D.; Pepe, G.; Abbate, R.; Gensini, G. F.; Serneri, G. G. N. Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients. *Thromb. Haemost.* 79:495-499, 1998.
- Jaroszowski, M. J.; Radcliff, G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol. Biotech.* 11:37-53, 1999.
- Moreno, P. R.; Bernardi, V. H.; López-Cuellar, J.; Murcia, A. M.; Palacios, I. F.; Gold, H. K.; Mehran, R.; Sharma, S. K.; Nemerson, Y.; Fuster, V.; Fallon, J. T. Macrophages, smooth muscle cells and tissue factor in unstable angina; implications for cell mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation.* 94:3090-3097, 1996.
- Morrissey, J. H. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost.* 86:66-74, 2001.
- Rao, L. V. M.; Pennurthi, U. R. Tissue factor on cells. *Blood Coag. and Fibrinol.* 9:(suppl 1):S27-S35, 1998.
- Santucci, R. A.; Ehrlich, J.; Labriola, J.; Wilsson, M.; Kao, K. J.; Kickler, T. S.; Soillert, C.; Mackman, N. Measurement of tissue factor activity in whole blood. *Thromb. Haemost.* 83:445-454, 2000.
- Semeraro, N.; Colucci, M. Tissue factor in health and disease. *Thromb. Haemost.* 78:759-764, 1997.

Endereço para correspondência:

Prof. Lauro Mello Vieira  
 Depto. de Anál. Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG  
 Av. Olegário Maciel, 2.360/608 - Belo Horizonte, MG - 30.180-112  
 Fone: (0xx31)3339-7647 - E-mail: lauro@farmacia.ufmg.br

# Caracterização bacteriana em culturas de ponta de cateter no Hospital Geral de Fortaleza

## Catheter tip's bacterial characterization from Fortaleza's General Hospital

Everardo Albuquerque Menezes<sup>1</sup>; Cecília Beatriz Fiuza Favali<sup>2</sup>; Francisco Afrânio Cunha<sup>1</sup>; Maria Núbia Cavalcante Salviano<sup>2</sup> & Maria Rozelê Ferreira Ângelo<sup>2</sup>

**RESUMO** – Este trabalho caracterizou a microbiota bacteriana presente em culturas positivas de ponta de cateter no Hospital Geral de Fortaleza – SUS durante o ano de 2000, verificando as bactérias mais frequentes e seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. As pontas de cateter foram roladas em ágar sangue e ágar Mac Conkey, incubadas por 24 horas à temperatura de 35°C. As culturas positivas foram submetidas à identificação e teste de susceptibilidade a antibióticos por metodologia automatizada (ATB - Bio Mérieux). Foram realizadas um total de 217 culturas de ponta de cateter, das quais 124 foram positivas (57%). As bactérias mais frequentes foram: *Staphylococcus* sp coagulase negativa e *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre os estafilococos não-produtores de coagulase, 63% foram resistentes à oxacilina, sendo a Vancomicina o antibiótico mais eficiente. Quanto às *Pseudomonas*, ao Imipenem e Colistina foram sensíveis.

**PALAVRAS-CHAVE** – Ponta de cateter, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Pseudomonas aeruginosa*.

**SUMMARY** – This study has characterized the bacterial microbioth in positives cultures at catheter tip in the Fortaleza's General Hospital - SUS, during the year of 2000, were verified the bacterias more frequent and your profile of susceptibility at the antibiotics. The catheter tip were rolled in the blood agar and MacConkey agar, incubated at 35°C for 24 hours. The positive culture were identified for ATB (Bio Mérieux) method and also the susceptibility tests. Were accomplished 217 cultures of the catheter tip, 124 were positives (57%). The bacterias more frequents were: coagulase negative *Staphylococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The coagulase negative *Staphylococcus* showed the resistente of 63% to the Oxacilina and the Vancomicina was more susceptible. In relation the *Pseudomonas aeruginosa*, Imipenem and Colistina were more susceptible.

**KEYWORDS** – Catheter tip, coagulase negative *Staphylococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

## INTRODUÇÃO

Atualmente há uma crescente preocupação com a caracterização da microbiota hospitalar, já que a questão da infecção hospitalar vem-se tornando alvo da preocupação dos profissionais de saúde que trabalham no ambiente hospitalar<sup>11</sup>.

O cateterismo vascular tem-se tornado uma prática vital e freqüente na medicina atual. Sabe-se que a presença do cateter aumenta o risco de colonização e disseminação de microrganismos, sendo este, na maioria das vezes, responsável pela disseminação bacteriana nos doentes internados, principalmente nos berçários de alto risco e Unidades de Terapia Intensiva (UTIs)<sup>18</sup>.

Por estar em contato diretamente com a corrente sanguínea, a colonização da ponta de cateter oferece um risco iminente de disseminação destas bactérias para o sangue. Cateteres colonizados por 15 ou mais

Unidades Formadoras de Colônias (UFC) constituem uma importante fonte de infecção. Logo podem causar facilmente uma bacteremia ou até septicemia<sup>15</sup>.

A barreira da pele é rompida pelo uso de cateteres intravenosos. Quanto mais tempo eles permanecem no local, maior o risco de infecção local e bacteremia. Um em cada 100 pacientes desenvolvem bacteremia adquirida no Hospital, metade dos quais são resultado da implantação de dispositivos intravenosos. Existem diferentes áreas, desde o frasco até o cateter intravenoso, onde a colonização pode ocorrer durante a terapia intravenosa. O risco de infecção relacionada ao cateter intravenoso é geralmente influenciado pelo tipo de cateter e a duração da cateterização<sup>5</sup>.

O isolamento dos Estafilococos Não Produtores de Coagulase (ENPCs) em materiais clínicos, pode trazer dúvida, pois esta bactéria pode tanto ser um contaminante da pele quanto um causador de bacteremia,

Recebido em 18/3/2002

Aprovado em 16/4/2002

\* Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza - SUS;

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará;

<sup>2</sup>Farmacêutica Bioquímica do Hospital Geral de Fortaleza - SUS

posteriormente à colonização de cateteres. Estas bactérias estão presentes nos vários sítios anatômicos do nosso corpo<sup>12</sup>.

O gênero *Pseudomonas* tornou-se o quarto patógeno nosocomial mais isolado nos últimos anos, sendo a causa de cerca de 10% de todas as infecções contraídas em hospital. Apesar de não ser considerada potencialmente patogênica para pessoas saudáveis, assume importante papel em diversas infecções em pacientes hospitalizados, debilitados por doenças crônicas ou sob o tratamento prolongado com quimioterápicos. Atualmente, o gênero *Pseudomonas* (principalmente a *Pseudomonas aeruginosa*) tem sido causa de septicemia e óbitos associados ao uso de cateteres, principalmente em UTI<sup>2,7</sup>.

Devido ao exposto acima, nosso objetivo foi caracterizar a microbiota bacteriana presente em culturas positivas de ponta de cateter no Hospital Geral de Fortaleza durante o ano de 2000, identificando as bactérias mais freqüentes e traçar o perfil de sensibilidade, aos antimicrobianos, das bactérias mais freqüentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta

A pele do paciente foi descontaminada ao redor do cateter com álcool iodado ou equivalente. Foi retirado o cateter com cuidado para que não houvesse contaminação. Foi cortada a ponta do cateter (em torno de 5cm) com bisturi estéril e esta foi colocada em frasco estéril com tampa de rosca.

### Transporte

A amostra foi transportada imediatamente para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza.

### Semeadura

A semeadura foi realizada logo após a chegada da amostra. Com o auxílio de uma pinça estéril foi retirada a ponta do cateter e esta foi rolada por toda a extensão da placa de ágar-sangue e ágar MacConkey, repetindo o movimento por quatro vezes. (Método semi-quantitativo de Maki)<sup>10</sup>.

### Isolamento

A amostra foi incubada à temperatura de 35°C por 24 horas. Foi verificado o crescimento e as colônias foram contadas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC)<sup>5,9</sup>. Nos casos em que não houve crescimento nas primeiras 24 horas, a placa foi reincubada por mais 24 horas.

### Identificação bacteriana e Teste de Susceptibilidade aos Antibióticos (TSA)<sup>5,8,9</sup>

As colônias obtidas, com contagem superior a 15ufc, foram submetidas à coloração de Gram e classificadas em cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos.

- Os cocos Gram-positivos foram submetidos à prova da catalase, para diferenciar os estafilococos dos estreptococos.
- Os bacilos Gram-negativos foram submetidos a prova da oxidase para diferenciar os fermentadores dos não fermentadores.
- Os cocos Gram-positivos catalase negativos foram submetidos à prova da Coagulase.
- Os bacilos Gram-negativos foram identificados pelo método semi automatizado ATB (BioMérieux).
- Os testes de susceptibilidade aos antibióticos foram realizados também pelo método ATB (BioMérieux).

## RESULTADOS

A Figura 1 apresenta a relação entre culturas positivas e negativas de ponta de cateter do Hospital Geral de Fortaleza durante o ano de 2000. Num total de 217 culturas realizadas, 93 (43%) foram negativas e 124 (57%) foram positivas.

A Figura 2 classifica o tipo de infecção (hospitalar ou comunitária) em culturas positivas de ponta de cateter. Num total de 124 culturas positivas, temos 119 (96%) de origem hospitalar enquanto apenas 5 (4%) de origem comunitária.

A Tabela I mostra as bactérias freqüentes em culturas positivas de ponta de cateter. As bactérias mais isolados foram os Estafilococos Não Produtores de Coagulase (25%), seguidos do gênero *Pseudomonas* (22%).

A Tabela II apresenta o perfil de sensibilidade dos Estafilococos Não Produtores de Coagulase. Verifica-se o alto índice de resistência à ampicilina e penicilina (93 e 96% respectivamente), a sensibilidade de 100% à vancomicina e 63% dos isolados resistentes à oxacilina.

A Tabela III apresenta o perfil de sensibilidade do gênero *Pseudomonas*. Verifica-se que a colistina (100% sensível), Imipenem e netilmicina (ambos 90% sensíveis) apresentam uma boa sensibilidade. Por outro lado à sulfa + trimetoprim apresentou um alto índice de resistência (95%).

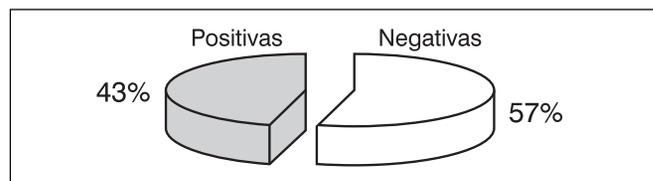


FIG. 1 - Relação entre culturas positivas (57%) e negativas (43%) de ponta de cateter. (Total: 217 culturas).

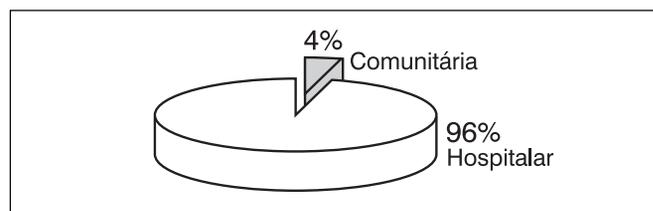


FIG. 2 - Classificação do tipo de infecção em culturas positivas de ponta de cateter. (Infecção hospitalar: 124).

TABELA I

Bactérias frequentes em culturas positivas de ponta de cateter no Hospital Geral de Fortaleza no período de janeiro a dezembro de 2000

Microorganismo	Nº de isolados
<b>Estafilococos não produtores de coagulase</b>	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
<i>Serratia marcescens</i>	12
<b>Estafilococos produtores de coagulase</b>	7
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	4
<b>BGN não identificado</b>	4
<i>Pseudomonas putida</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	2
<i>Streptococcus</i> sp	1
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1
<i>Salmonella</i> sp	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
<b>Total</b>	<b>124</b>

TABELA II

Perfil de sensibilidade dos estafilococos não-produtores de coagulase no Hospital Geral de Fortaleza no período de janeiro a dezembro de 2000

Antibiótico	% de sensibilidade	% de resistência
Oxacilina	37	63
Penicilina	4	96
Ampicilina	7	93
Vancomicina	100	0
Ceftriaxona	50	50
Imipenem	47	53
Tetraciclina	78	22
Eritromicina	37	63
Clindamicina	40	60
Gentamicina	20	80
Amicacina	57	43
Rifampicina	56	44
Quinolonas	53	47
Sulfa + Trimetoprim	58	42

TABELA III

Perfil de sensibilidade das *Pseudomonas aeruginosa* no Hospital Geral de Fortaleza no período de janeiro a dezembro de 2000

Antibiótico	% de sensibilidade	% de resistência
Netilmicina	90	10
Gentamicina	48	52
Amicacina	46	54
Tobramicina	34	66
Carbenicilina	23	77
Imipenem	90	10
Cefotaxima	28	72
Ceftriaxona	28	72
Ceftazidima	35	65
Ticarcilina	34	66
Piparacilina+Tazobactam	54	46
Colistina	100	0
Cefepime	50	50
Aztreonam	50	50
Sulfa + Trimetoprim	5	95

## DISCUSSÃO

No presente trabalho foi verificado que de um total de 217 culturas de ponta de cateter, 124 foram positivas, representando uma porcentagem significativa de 57%. (Figura 1) sendo 96% destas infecções classificadas como hospitalares (Figura 2).

Quanto à frequência de bactérias, percebemos que o primeiro lugar ficou com os Estafilococos Não Produtores de Coagulase que, apesar de fazerem parte da microbiota normal da pele, vem ganhando importância na atualidade, estando relacionados ao aumento de morbidade em doentes internados em UTI e berçários de alto risco, como verificado por Tenover *et al.*<sup>16</sup>.

O isolamento dos Estafilococos Não Produtores de Coagulase (ENPCs) nestas culturas pode trazer dúvida, pois esta bactéria pode tanto ser um contaminante da pele quanto um causador de bacteremia, posteriormente à colonização de cateteres<sup>3</sup>. Esta dificuldade se agrava quando as ufcs encontradas na amostra apresentam valores limítrofes (por exemplo: 10-20 ufcs). Nestes casos o diagnóstico clínico auxilia muito a interpretação destes resultados. Já a presença de outros patógenos é bem mais característica de colonização do cateter (por exemplo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e outras).

Em segundo lugar, com uma diferença mínima, vem a *Pseudomonas aeruginosa*. Esta espécie assume um papel muito importante em doentes hospitalizados, nos quais, torna-se potencialmente patogênica, estando bastante associada aos casos de septicemia e óbitos associados ao uso de cateteres, principalmente em UTIs<sup>17</sup> (Tabela I). Mortágua *et al.*<sup>6</sup> & Souza *et al.*<sup>13</sup>, em um trabalho semelhante ao nosso no Instituto Lauro de Sousa Lima também coloca a *Pseudomonas* como umas das bactérias mais isoladas e bastante resistente aos antimicrobianos testados. A *Pseudomonas aeruginosa*, apesar de não ser considerada potencialmente patogênica para pessoas saudáveis, assume importante papel em diversas infecções em pacientes hospitalizados, debilitados por doenças crônicas ou sob o tratamento prolongado com quimioterápicos<sup>1</sup>.

Quanto à eficácia dos antimicrobianos aos Estafilococos Não Produtores de Coagulase, verifica-se que 63% dos isolados são resistentes à oxacilina. Tal resistência somada a outros fatores vem favorecendo o aumento das infecções causadas por estes microrganismos<sup>4</sup>. A Vancomicina é o antimicrobiano mais eficaz, tendo ação sobre todos os microrganismos isolados (Tabela 2). Os antimicrobianos menos eficazes foram a Penicilina e a Ampicilina. Este mesmo dado já é bastante discutido na literatura<sup>12</sup>.

Em relação ao gênero *Pseudomonas*, verificou-se que a Colistina, Imipenem e a Netilmicina foram os antibacterianos mais eficazes (Tabela 3). A Sulfa + Trimetoprim apresentou o maior índice de resistência (95%), seguido da carbenicilina (77%) e da cefotaxima e ceftriaxona (ambas com 72%). Resultados semelhantes foram obtidos por Mortágua *et al.*<sup>6</sup> & Souza *et al.*<sup>13</sup>.

Com os resultados obtidos neste estudo esperamos sensibilizar os profissionais de saúde ao uso indevido

e indiscriminado de antibióticos pois, segundo Tavares<sup>14</sup>, esta é a razão da principal resistência bacteriana nosocomial que está acontecendo em todo o mundo.

## REFERÊNCIAS

1. Barriere, S. L.; Jacobs, R. A. Clinical use of antimicrobials. In: Katzung, Bertram G. *Pharmacology Basic & Clinical*. 6<sup>th</sup> edition. New Jersey: Appleton & Lange. p.752-68. 1995.
2. Beltrame, R. E.; Silva, C. R.; Tanaka, I. I.; Sornas, A. M. F. *Pseudomonas aeruginosa - antibioticoterapia e perfil de resistência de cepas isoladas das UTIs dos hospitais da Faculdade de Medicina de Marília* [on line]. Disponível na Internet via <http://www.google.com>. Arquivo capturado em 10 de junho de 2000.
3. Garrett, D. O.; Jochimsen, E.; Murfitt, K.; Hill, B.; McAllister, S.; Nelson, P.; Spera, R. V.; Sall, R. K.; Tenover, F. C.; Johnston, J.; Zimmer, B.; Jarvis, W. R. The emergence of decreased susceptibility to Vancomicina in *Staphylococcus epidermididis*. *Infection Journal of Medicine*, 20:167-170. 1999.
4. Gilbert, D. N.; Moellering, R. C.; Sande, M. A. *The Sanford guide to antimicrobial therapy*. 30<sup>th</sup> Edition. Utah. p.53. 2000.
5. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr, W. C. *Diagnóstico microbiológico*. 5<sup>th</sup> edition. 2001.
6. Mortágua, P. S.; Lopes, M. M. R.; Germino, R. V.; Campos, A. K. O. Incidência e perfil de resistência de *Pseudomonas* isoladas de pacientes do Instituto Lauro de Sousa Lima (ILSL) no período de janeiro/98 a maio/99 - in XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1999.
7. Murray, P. R.; Drew, W. L.; Kobayashi, G. S.; Thompson Jr, J. H. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara Koogan S.A. 2000.
8. Nakae, T.; Nakajima, A.; Ono, T.; Saito, K.; Yoneyama, H. Resistance to  $\alpha$ -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and  $\alpha$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.43, n.5, p.1301-03. 1999.
9. Pilonetto, M.; Pilonetto, D. V. *Manual de procedimentos laboratoriais em microbiologia - POPs em microbiologia*. Microscience. 1998.
10. Rodrigues, R. R. O.; Uber, A. P.; Yokoo, S.; Garcia, L. B.; Tognim, M. C. B. Medida quantitativa da aderência "in vitro" da cepas de *Acinetobacter baumannii* a cateteres intravasculares. in XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1999.
11. Schaechter, M.; Medoff, G.; Eisenstein, B. L. *Mechanisms of microbial disease*. 2<sup>nd</sup> edition. 1993.
12. Schwalbe, R. S.; Stapleton, J. T.; Gilligan, P. H. Emergence of Vancomycin resistance in coagulase negative *Staphylococcus*. *New England Journal of Medicine*. 316:927-931. 1987.
13. Souza, K. C. M.; Valadão, L. M.; Nojimoto, A. I. T. I. Ocorrência e perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sítio cirúrgico. in XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1999.
14. Tavares, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos*. 2<sup>a</sup> Edição, São Paulo-SP. Editora Atheneu Editora. 1996.
15. Trabulsi, L. R.; Aletherthum, F.; Gompertz, A. F.; Candeias, J. A. N. *Microbiologia*. 3<sup>a</sup> edição, Rio de Janeiro-RJ. Livraria Atheneu Editora. 1999.
16. Tenover, F. C.; Lancaster, M. V.; Hill, B.; Steward, C. D.; Stoker, S. A.; Hancock, G. A.; O'Hara, C. M.; McAllister, S. W. K.; Clark, N. C.; Hiramatsu, K. Characterization of *Staphylococcus* with reduced susceptibilities to Vancomicina and others glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(4):1020-1027. 1998.
17. Troillet, N.; Samore, M. H.; Carmeli, Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin. Infect. Dis.* v.25, n.1, p.1094-98. 1997.
18. Veronesi, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8<sup>a</sup> edição. Guanabara Koogan, São Paulo. 1991.

Endereço para correspondência

Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes

DACT/FFOE/UFC - E-mail: menezes@ufc.br

Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 - Fortaleza, Ceará - 60430-370

## Curso teórico-prático em micologia

# Identificação e caracterização de fungos oportunistas

### Coordenação Geral

Prof. Márcio Nucci – Laboratório de Micologia - Hospital Universitário - UFRJ

Prof. Paulo Murillo Neufeld - Laboratório de Micologia Clínica - Faculdade de Farmácia - UFRJ

**Professores:** Dr. Josep Guarro - Espanha; Dr<sup>a</sup> Josepa Gené - Espanha; Dr. Luís Zaror - Chile

### Objetivos

Proporcionar subsídios para a correta identificação de fungos de importância médica

**Público alvo:** Médicos, Farmacêuticos, Biomédicos, Biólogos e Médicos Veterinários

**Período:** 7 a 11 de outubro de 2002

**Horário:** 8 às 17h

**Carga Horária:** 40h

**Vagas:** 80 vagas (55 vagas para o curso teórico e 25 vagas para o curso teórico-prático)

**Inscrição:** Ficha preenchida; *curriculum vitae* resumido e carta de apresentação

### Local

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Faculdade de Farmácia

Prédio do CCS, bloco A, 2<sup>o</sup> andar, sala 025, Ilha do Fundão

Rio de Janeiro-RJ, 21941-590

Tel.: (021) 2562-6405, 2562-6421, 2562-6423

E-mail: labclin@pharma.ufrj.br

# Freqüência de leveduras isoladas em mãos de profissionais de saúde em um hospital público de João Pessoa-PB\*

## Frequency of yeast isolated from hands of healthcare workers in a public hospital at João Pessoa – Paraíba, Brazil

Iolanda Beserra da Costa Santos<sup>1</sup>; Neuza Maria Cavalcante Oliveira<sup>2</sup>; Geofabio S. Casimiro<sup>3</sup>; Danilo Elias Xavier<sup>3</sup>; Isabele B. Santos<sup>3</sup> & Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>4</sup>

**RESUMO** – As mãos colonizadas podem carrear espécies de fungos que são capazes de causar infecção em pacientes imunocomprometidos no ambiente hospitalar. Foram coletadas 183 amostras clínicas oriundas de espaços interdigitais e 151 de escamas ungueais em mãos de profissionais de saúde de sete setores do Hospital Universitário Lauro Wanderley de João Pessoa-PB, objetivando identificação de espécies de leveduras utilizando os métodos clássicos e o comercial CHROMagar<sup>®</sup>. A coleta dos dados foi realizada de outubro de 2000 a maio de 2001, e as amostras foram processadas no Laboratório de Micologia do DCF/CCS/UFPB. Os resultados demonstraram que as clínicas Cirúrgica e Médica tiveram maior participação 33/183 (18,0%) profissionais. As categorias mais trabalhadas foram: técnicos e auxiliares de enfermagem 116 funcionários, com exames de interdígitos, 94 escamas ungueais. Obteve-se uma positividade de 57/183 (31,1%) de colonização dos espaços interdigitais, 14/151 (9,3%) de escamas ungueais. Houve prevalência de *Candida parapsilosis* 34/57 (59,6%), *Candida tropicalis* 16/57 (28%) nos espaços interdigitais. Os achados mostraram freqüência de *Candida parapsilosis*, 08/14 (57,1%) em escamas ungueais, enquanto *C. tropicalis* e *C. albicans* apresentaram 03/14 (21,4%). Concluiu-se que, a *Candida parapsilosis* foi prevalente e que, juntamente, com as demais espécies constituem um problema, quando se encontram em ambiente propício para seu desenvolvimento e disseminação.

**PALAVRAS-CHAVE** – Profissionais de saúde, leveduras, hospital.

**SUMMARY** – Colonized hands can disseminate opportunistic yeasts and develop infections in immunocompromised patients. The purpose of this study was to determine the yeasts frequency in the health care workers (HCWs) hands, at the different wards of a University Hospital "Lauro Wanderley" linked to the Federal University of Paraíba, in João Pessoa/Brazil. Were studied 183 from interdigital spaces, and 151 from ungueal squames, obtained between October 2000 and May 2001, and processed by classical methods and using the alternative CHROMagar. The majority of the samples were from the medical and surgical wards, with 33/183 (18.0%) HCWs each one, and main professional category was the Technical Nurse with 116 samples from interdigital spaces and 94 ungueal squames. The results indicate a positivity of 14/151 (9.3%) to interdigital colonization, as well as, 14/151 (9.3%) to the ungueal squames, with the prevalence in the interdigital spaces of *Candida parapsilosis* (59.6%) and *Candida tropicalis* (28.0%) respectively. These clinical findings demonstrate that *Candida parapsilosis* reach 57.1% of frequency from ungueal squames, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* (21.4%) each one. In conclusion, must be considered that *Candida parapsilosis* and the others species constitute an important problem when exists conditions to the development and dissemination of these microorganisms.

**KEYWORDS** – Health care workers, yeasts, hospital.

## INTRODUÇÃO

Historicamente, as espécies do gênero *Candida* foram estudadas por Langenbeck, em 1839, que observou a mais importante levedura patogênica ao homem, em aftas bucais de um paciente com tifo, tendo considerado erradamente esse microrganismo como o

agente etiológico da doença. Posteriormente, em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral e classificou esse microrganismo como *Sporotrichum*. Berg em 1846, também estudou detalhadamente o organismo e o relacionou com a candidíase oral. Alguns anos depois em 1923, Berkhout transferiu esse patógeno para o gênero *Candida* e o alocou na espécie *C. albicans*<sup>11</sup>. Para

Recebido em 1/11/2001

Aprovado em 28/02/2002

<sup>1</sup>Profª de Enfermagem Cirúrgica do Depto. de Enfermagem Médico-Cirúrgica e Administração CCS/UFPB. Doutoranda em Ciências da Saúde /CCS/UFPB.

<sup>2</sup>Farmacêutica Bioquímica do Laboratório de Micologia do DCF/CCS/UFPB. Mestre em Doenças Infecciosas.

<sup>3</sup>Bolsistas do Programa PIBIC/CNPq. Acadêmicos do Curso de Farmácia da UFPB.

<sup>4</sup>Professora de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB. Doutora em Micologia.

\*Trabalho realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB.

Richardson *et al.*, 1994, o termo candidíase é usado para referir infecções no organismo pelo gênero *Candida* e não apenas pela *C. albicans*.

O ser humano encontra-se constantemente exposto aos fungos oportunistas, sendo que a maioria das pessoas tolera este contato sem conseqüências mais sérias para sua saúde e outras pessoas podem desenvolver alguns tipos de reação<sup>15</sup>. Na verdade, existem duas razões básicas para que isto aconteça: a primeira está relacionada com os indivíduos imunologicamente competentes, que possuem alta resistência à colonização por fungos e a segunda, está relacionada à baixa virulência fúngica. Todavia, outros fatores intrínsecos e extrínsecos importantes a serem considerados estão relacionados com a debilidade do hospedeiro, tornando, por isso estes fungos patogênicos pela vulnerabilidade do sistema imunológico, permitindo a colonização de vários órgãos<sup>10</sup>. Considerando ainda os fatores ligados à infecção por fungos, pode-se apontar a negligência na higienização das mãos dos profissionais de diferentes setores do hospital, possibilitando, dessa forma, a disseminação de infecções<sup>3</sup>.

O papel da microbiota, cuja própria *Candida* faz parte, no controle das infecções por espécies desse gênero se dá através da formação de uma barreira física entre a mucosa e a levedura, o que interfere com o processo de adesão desses microrganismos. Se essa microbiota é suprimida, a colonização por *Candida* comensal pode aumentar em virtude da disponibilidade de receptores celulares<sup>19</sup>. A maioria dos fungos provenientes do meio externo não apresenta uma virulência clássica, isso é inerente à própria espécie fúngica. Mas, os fungos que se depositam sobre a pele e mucosas e os que são inalados não produzem nenhum dano, desde que as barreiras naturais de defesa do hospedeiro estejam íntegras, pois estas impedem a instalação desses fungos, a produção de reação tecidual, e conseqüentemente doenças<sup>9,17</sup>.

Em década recente, estudo epidemiológico sobre infecções fúngicas tem sido valorizado e requerido atenção especial por parte dos especialistas no assunto, seja pela caracterização ao nível de espécie ou para melhor trabalhar o problema do processo de infecção e o modo de transmissão pelo qual estes microrganismos se reproduzem<sup>7</sup>. Muitos fungos que anteriormente eram reconhecidos como não patogênicos, passaram a ser hoje imputados como causas de infecções pelo comprometimento no grupo de pacientes com imunossupressão transitória ou permanente, como nos casos de leucemia, linfomas, *Diabetes mellitus*, câncer, SIDA e outras causas que deprimem o sistema imune<sup>16,17</sup>.

A candidíase é a mais freqüente infecção fúngica oportunista no hospital. Essas infecções têm apresentado a prevalência de 80% nos hospitais terciários do Brasil. É um índice preocupante, no que se refere à mortalidade relacionada por candidíase, que gira em torno de 40% na atribuída e 60% na associada<sup>5</sup>. Tradicionalmente, sabe-se que a *Candida* é capaz de causar doença no homem, produzindo diversos tipos de

quadros clínicos, entre estes: lesões cutâneo-mucosas, sistêmica ou visceral e alérgica.

As lesões cutâneos-mucosas acontecem com acometimentos de pele, unhas, mucosas orofaríngeas e genitais. A sistêmica ou visceral caracteriza-se por sintomatologia infecciosa localizada e que, em algum período de sua evolução, disseminou-se para outros órgãos por via hematogênica ou de forma exógena como no caso de disseminação por infusão de líquidos contaminados. Nas alérgicas, o organismo poderá reagir de três maneiras: a primeira pode não apresentar lesão clínica e o teste imunológico não aparece positivo; a segunda apresenta ausência de manifestações clínicas e provas imunológicas positivas, caracterizando apenas um contato com um tipo de leveduras em algum tempo e, por último, a alérgica, que se caracteriza por quadros clínicos diversos, onde se observam lesões cutâneas do tipo vesiculosas, lesões eczematóides estéreis, encontradas nos espaços interdigitais das mãos e/ou em outras partes do corpo, que desaparecem com a resolução da infecção por *Candida*.

As micoses superficiais causadas por leveduras caracterizam-se por se encontrarem restritas à região superficial da pele ou das mucosas, não atingindo a derma e nem a submucosa, não produzindo desta forma, reações granulomatosas. As micoses superficiais são produzidas mais freqüentemente por leveduras do gênero *Candida*, mas, existem outras espécies como *Malassezia*, *Trichosporon*, *Geotrichum* e *Cryptococcus* que podem também estar envolvidas nesse quadro clínico<sup>4,18</sup>.

O quadro clínico relacionado à candidíase cutâneo-mucosa inclui acometimento de pele e seus anexos, mucosas e regiões genital e anal<sup>17</sup>. A candidíase cutânea superficial pode ser observada, como tendo origem primária, comprometendo regiões onde há exudação excessiva e maceração. As pessoas obesas, alcoólatras e diabéticas apresentam uma maior predisposição a infecções por *Candida*. Nestes casos, as lesões são mais encontradas nas regiões inframamárias, infrapúbicas, axilares, inguinocrurais e nas pregas suprapúbicas. Outros sítios anatômicos comprometidos estão relacionados às regiões interdigitais palmares e plantares. O principal fator predisponente é a atividade ocupacional, na qual a exposição à água favorece a maceração<sup>13</sup>.

Com o aumento na incidência de infecções causadas por fungos após o surgimento da AIDS, que determinou um grande número de indivíduos imunodeficientes na população, a micologia passou a interessar médicos e profissionais do laboratório clínico. Neste sentido, o diagnóstico micológico baseado no exame direto e em meios disponíveis no mercado tornou-se muito procurado. Em função disto, diversos protocolos para identificação desses agentes têm sido desenvolvidos.

Pfaller *et al.*, 1996, utilizaram o CHROMagar<sup>®</sup> para identificar de forma rápida leveduras do gênero *Candida* a partir de culturas de vigilância obtidas de pacientes internados em clínica cirúrgica e UTI neonatal. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de

verificar a frequência de leveduras em espaços interdigitais e escamas ungueais de profissionais da saúde que trabalham nas clínicas de internação e no bloco cirúrgico do Hospital Universitário e identificar as espécies de leveduras mais prevalentes nas mãos destes profissionais, através dos métodos clássicos e do comercial CHROMagar®.

## METODOLOGIA

A pesquisa teve o enfoque quantitativo, com denominação experimental que Rossi Junior (1990) descreve como requisito existencial na obtenção de novas verdades para a ciência. O estudo foi realizado no período de outubro de 2000 a maio de 2001 nos diferentes setores (clínica cirúrgica, clínica médica, clínica pediátrica, clínica obstétrica, doenças infecto contagiosas, bloco cirúrgico e centro de terapia intensiva) do Hospital Universitário "Lauro Wanderley" da Universidade Federal da Paraíba, considerado de grande porte, funcionando com 240 leitos e atendendo a todas as especialidades. Levou-se em consideração os aspectos éticos e legais da pesquisa que envolve seres humanos, preconizados pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde<sup>1</sup>, no que diz respeito ao termo de consentimento livre e esclarecido.

A população constituiu-se de 334 manuseios das mãos direita e esquerda (MD e ME) de profissionais de saúde em serviço, sendo 183 amostras procedentes de espaços interdigitais coletadas por meio de "swab" estéril umedecidos em solução salina e colocados no tubo de ensaio, identificado com etiquetas autocolantes, indicando a clínica de origem do funcionário e a categoria funcional, e 151 raspagens de escamas ungueais das mãos direita e esquerda com auxílio de lâmina microscópica, utilizando placas de Petri pequenas que eram colocadas abaixo das mãos para receber os fragmentos no momento da raspagem das unhas, e que também foram identificados com o mesmo número do formulário para em seguida serem transportadas ao laboratório.

Para isolamento das leveduras, as amostras foram semeadas no meio de Agar Sabouraud-Dextrose adicionado de 40µg/ml de cloranfenicol, e incubadas a temperatura de 37°C no período de 24-48 horas. Para

identificação das espécies de leveduras, utilizou-se os métodos clássicos e em paralelo o meio denominado CHROMagar®. No primeiro método, foi realizado microcultivo em agar arroz contendo Tween-80, para observação de pseudo-filamentação e clamidosporo, e provas bioquímicas incluindo zimograma, auxonograma e urease para avaliação do comportamento bioquímico de gênero *Candida*<sup>2,4,6,17</sup>.

No método comercial CHROMagar®, o meio foi preparado de acordo com as especificações do fabricante, realizando-se a semeadura na superfície do meio seguida de incubação à temperatura ambiente para posterior leitura. As leveduras foram identificadas pela presença de diferentes pigmentos produzidos a partir de uma reação enzimática, espécie específica, sobre um substrato cromogênico contido no meio. Foi observada a presença de pigmentação diferenciada para as diversas espécies de *Candida*, comparando-se assim os dois métodos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados encontrados na amostragem revelam que, as 183 coletas realizadas corresponderam a 366 manuseios, pelo fato de se trabalhar as mãos direita e esquerda dos investigados. Foram coletados 116/183 (63,4%) materiais nos espaços interdigitais de técnicos e auxiliares de enfermagem e 55/183 (30%) de enfermeiros. Esses profissionais constituíram a maioria de toda amostra, portanto, são mencionados, apesar de trabalhar outras categorias como mostram as Tabelas 1 e 2. Nos exames de escamas ungueais, a maioria concentrou-se entre técnicos e auxiliares de enfermagem, perfazendo um quantitativo de 94/151 (62,3%), seguido de enfermeiros 45/151 (29,8%) com as demais categorias menos representativas. Quanto às espécies de leveduras identificadas, houve uma frequência para *C. parapsilosis* nos espaços interdigitais 34/57 (59,6%), seguido de *C. tropicalis* 16/57 (28,0%), para as mesmas categorias de profissionais já citadas. Em relação aos resultados de escamas ungueais, *C. parapsilosis* foi encontrada em 08/14 (57,1%), *C. albicans* 03/14 (21,4%), e *C. tropicalis* 3/14 (21,4%) dos exames realizados. As clínicas que os profissionais participaram com mais assiduidade foram: a Clínica Médica e C.



FIG. 1 - Técnica de coleta das amostras clínicas em escamas ungueais.

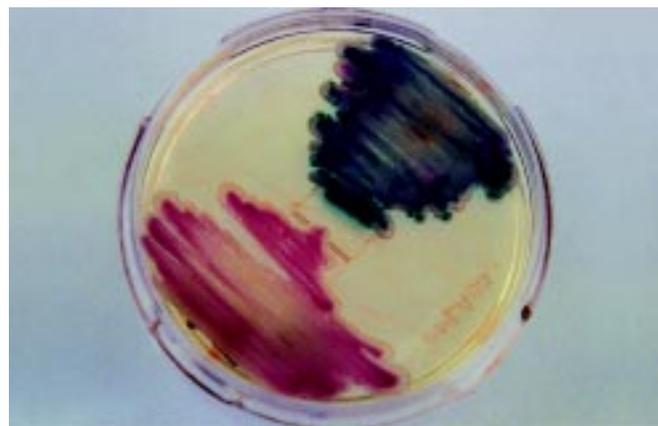


FIG. 2 - Aspecto do crescimento das leveduras no CHROMagar®.

**TABELA I**  
Distribuição da população que realizou exames de interdígitos segundo a categoria funcional e a clínica de trabalho

Clínica	Categoria funcional										
	Aux. enferm.	Enfermeiro	Técnico	Médico	Operacional	Secretário	Assist. social	Nutricionista	Estagiário	Sub total	%
Cirúrgica	22	09	-	-	-	02	-	-	-	33	18,0
Médica	21	09	02	-	-	-	01	-	-	33	18,0
Pediátrica	16	08	-	-	01	-	-	-	01	26	14,2
Obstétrica	15	08	02	-	-	-	-	-	-	25	13,7
DIC	12	07	01	01	-	-	-	-	-	21	11,5
B. cirúrgico	11	04	01	01	-	-	-	-	-	17	9,3
CTI	08	05	05	01	02	01	-	01	-	23	12,6
Outros	-	05	-	-	-	-	-	-	-	05	2,7
<b>Total</b>	<b>105</b>	<b>55</b>	<b>11</b>	<b>03</b>	<b>03</b>	<b>03</b>	<b>01</b>	<b>01</b>	<b>01</b>	<b>183</b>	
<b>%</b>	<b>57,4</b>	<b>30,0</b>	<b>6,0</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>		<b>100</b>

**TABELA III**  
Distribuição de espécies do gênero *Candida* isoladas nos espaços interdígital de profissionais segundo a clínica analisada

Clínica	Gêneros					Subtotal
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. stellatoidea</i>	<i>T. beigellii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	
Cirúrgica	11	01	-	-	-	12
Médica	03	02	-	-	01	06
Pediátrica	04	07	-	-	-	11
Obstétrica	05	02	01	-	-	08
DIC	03	02	01	-	-	06
B. cirúrgico	01	01	-	02	-	04
CTI	07	01	-	02	-	10
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>16</b>	<b>02</b>	<b>04</b>	<b>01</b>	<b>57</b>
<b>%</b>	<b>59,6</b>	<b>28,0</b>	<b>3,6</b>	<b>7,0</b>	<b>1,8</b>	<b>100</b>

Cirúrgica com 33/183 (18,0%) de funcionários nos exames dos espaços interdígital, e 29/151 (19,2%) de escamas ungueais da Clínica Cirúrgica, seguido da Clínica Médica 27/151 (17,9%).

Em relação às cepas de leveduras encontradas, estudos como os de Heredia (1993), Lemes (1998); Marino (1998), revelaram cepas semelhantes. Tais dados demonstram que, a microbiota hospitalar das mãos de profissionais de saúde do hospital pesquisado se assemelha aos demais, quando comparado a outros trabalhos que foram realizados no Brasil. Com relação aos resultados do laboratório, quando combinados os testes clássicos morfológicos e bioquímicos, com o método comercial CHROMagar®, observa-se que houve uma excelente semelhança na identificação das leveduras, em praticamente 100% de todas as amostras consideradas. A única cepa que apresentou discordância foi na identificação da *C. parapsilosis* sem implicação maior para a finalidade a que o estudo se propôs, as demais se confirmaram com os testes clássicos. A *C. parapsilosis* por ser a mais prevalente do grupo das espécies encontradas, foi detectada divergência quando co-relacionada com as demais leveduras isoladas. As cepas de *T. beigellii* têm importância clínica quando comparadas às demais leveduras encontradas, todos os achados se constituíram de grande relevância no estudo.

A exemplo de outros trabalhos<sup>12,19</sup> que estudaram leveduras, nossos achados indicam, em primeira instância, a importância em se adotar uma metodologia

**TABELA II**  
Distribuição da população que realizou exames de escamas ungueais segundo a categoria funcional e a clínica de trabalho

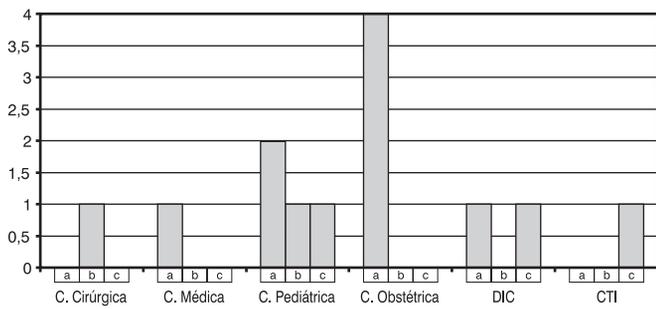
Clínica	Categoria funcional									
	Aux. enferm.	Enfermeiro	Técnico	Médico	Operacional	Secretário	Nutricionista	Sub total	%	
Cirúrgica	19	08	-	-	01	01	-	29	19,2	
Médica	17	07	03	-	-	-	-	27	17,9	
Pediátrica	14	08	-	-	01	-	-	23	15,2	
Obstétrica	13	07	01	-	01	-	-	22	14,6	
DIC	10	05	01	01	-	-	-	17	11,3	
B. cirúrgico	09	03	01	-	-	-	-	13	8,6	
CTI	04	05	02	02	03	01	01	18	11,9	
Outros	-	02	-	-	-	-	-	02	1,3	
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>45</b>	<b>08</b>	<b>03</b>	<b>06</b>	<b>02</b>	<b>01</b>	<b>151</b>		
<b>%</b>	<b>56,9</b>	<b>29,8</b>	<b>5,3</b>	<b>2,0</b>	<b>3,9</b>	<b>1,4</b>	<b>0,7</b>		<b>100</b>	

**TABELA IV**  
Distribuição de espécies do gênero *Candida* isoladas de escamas ungueais de profissionais segundo a clínica analisada

Clínica	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	Subtotal
Cirúrgica	-	01	-	01
Médica	01	-	-	01
Pediátrica	02	01	01	04
Obstétrica	04	-	-	04
DIC	01	-	01	02
CTI	-	01	01	01
<b>Total</b>	<b>08</b>	<b>03</b>	<b>03</b>	<b>14</b>
<b>%</b>	<b>57,1</b>	<b>21,4</b>	<b>21,4</b>	<b>100</b>

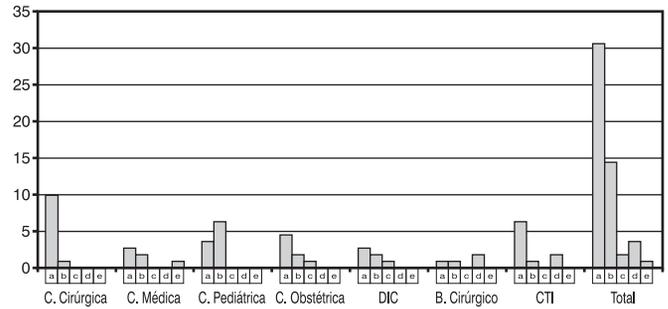
simples que possibilite a identificação rápida das amostras com evidências de leveduras e que possa ser utilizada como orientação na terapêutica clínica de algumas micoses superficiais da pele, mãos e unhas de profissionais atuando no ambiente hospitalar. A maioria dos fungos provenientes do meio externo, não apresenta uma virulência clássica, sendo esta inerente à própria espécie fúngica. Mas, os fungos que se depositam sobre nossa pele e mucosas e os que são inalados, não produzem nenhum dano, desde que as barreiras naturais de defesa do hospedeiro estejam íntegras, impedindo a instalação desses fungos com dano tecidual e, por conseguinte, doenças. A maioria dos fungos encontrados não possui significado clínico por constituírem microbiota do homem, mas, quando se trata de pessoas hospitalizadas, imunocomprometidas ou que tenham solução de continuidade na pele se configura um problema.

Pôde-se comprovar que o meio CHROMagar® apresentou um padrão de sensibilidade e especificidade satisfatório, quando comparado aos testes clássicos na identificação das leveduras, confirmando que este método é simples, rápido e eficaz para pesquisa em laboratório. Conclui-se, recomendando ao grupo do hospital, que as leveduras oportunistas, independente da espécie, têm implicações para o doente, pessoal do serviço e para o hospital; que o meio CHROMagar® como método de identificação foi eficaz para a bateria de fungos testados; que existe diferentes espécies de leveduras nas mãos dos profissionais do hospital. Sendo as-



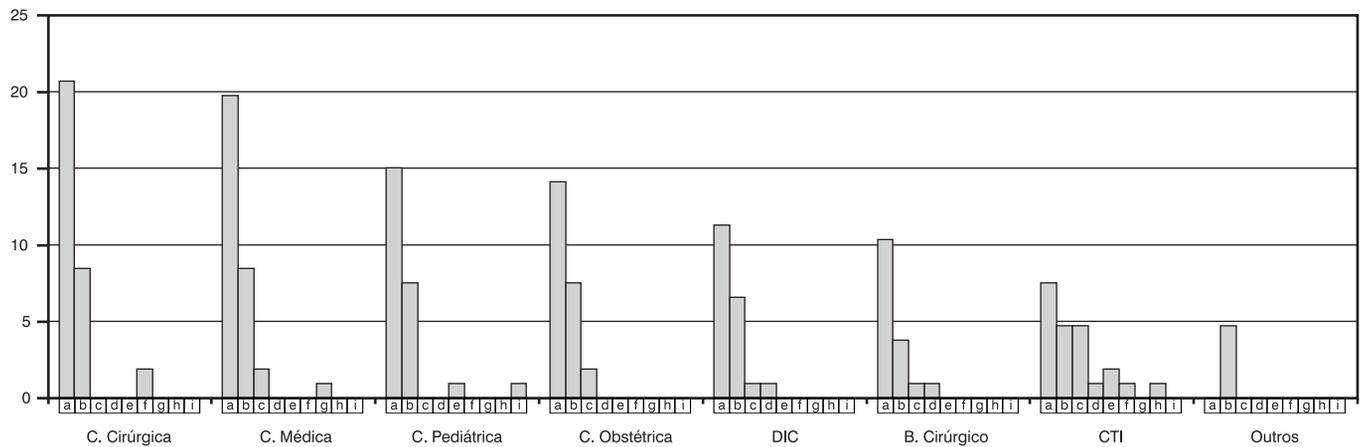
a) *C. parapsilosis*; b) *C. tropicalis*; c) *C. albicans*

GRÁFICO 1 - Distribuição de espécies do gênero *Candida* isoladas de escamas ungueais de profissionais de saúde segundo clínica analisada.



a) *C. parapsilosis*; b) *C. tropicalis*; c) *C. stellatoidea*; d) *T. beigelli*; e) *C. guilliermondii*

GRÁFICO 2 - Distribuição de espécies do gênero *Candida* isoladas nos espaços interdigtos de profissionais de saúde segundo clínica pesquisada.



a) Auxiliar; b) Enfermeiro; c) Técnico; d) Médico; e) Operacional; f) Secretário; g) Assistente social; h) Nutricionista; i) Estagiário

GRÁFICO 3 - Distribuição da população amostral que realizou exames de Interdígito segundo categoria funcional e clínica de trabalho.

sim, recomenda-se que outras pesquisas sejam realizadas utilizando os dados de laboratório para evitar falhas na postura terapêutica em presença de leveduras nas mãos de funcionários hospitalares.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos funcionários do HULW que se mostraram solícitos no decorrer da coleta para realização deste estudo. A todos os técnicos do Laboratório de Micologia pela colaboração e empenho no desenvolvimento deste trabalho. Ao Prof. Lauro Santos Filho pela revisão dos originais.

## REFERÊNCIAS

- 1 Brasil, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle das DST/AIDS. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Conselho Nacional de Saúde. Brasília, 17p. 1996.
- 2 Crissey, J. T.; Lang, H.; Parish, L. C. *Manual of medical mycology*. Cambridge, Blackwell Science, 263p. 1995.
- 3 Heredia, M. S. Colonização por leveduras em crianças hospitalizadas potencialmente imunocomprometidas e em profissionais de saúde com elas relacionadas. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 95p. 1993.
- 4 Lacaz C. S.; Porto, F.; Martins, J. E. C. *Micologia médica*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 695p. 1991.
- 5 Lapchik, M. S. Infecções fúngicas. Novo arsenal terapêutico para o combate contra a candidíase sistêmica. *Racional Hospitalar*. 03(06):08-12, 2000.
- 6 Larone, D. H. *Medically important fungi*. 3ª ed. Washington: ASM Press, 274p. 1995.
- 7 Lemes, R. M. L. *Análise fenotípica e genotípica de leveduras isoladas de ambiente hospitalar, profissionais de saúde e pacientes: implicações na colonização e rotas de infecção*. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo. 107p. 1998.

- 8 Marino, C. G. J. *Epidemiologia da colonização e infecção por Candida spp. por pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva*. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 103p. 1998.
- 9 Milan, E. P. *Estudo microbiológico de leveduras isoladas em cavidade oral de pacientes com AIDS*. (Dissertação de Mestrado em Odontologia). Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 89p. 1997.
- 10 Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Kobayashi, G. S. *et al. Microbiologia médica*. 3ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 604p. 2000.
- 11 Online. 2001 <http://www.internesb.br/inesp/cursos/biologia/microbiologia/unid.1html> disponível na internet, acesso em 8/11/2001.
- 12 Pfaller, M. A.; Houston, A.; Coffmann, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida cruzi* and *Candida (torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 34 (1): 58 - 61, 1996.
- 13 Richardson, M. D.; Warnock, D.W. *Fungal infection - diagnosis and management*. 3ª edition. Blackwell Scientific Publications. Great Britain, p.61-73, 1994.
- 14 Rossi Junior, R. *Metodologia científica para a área de saúde*. São Paulo: Pancast, 1990.
- 15 Santos, I. J.; Masutt, M. L.; Berenhauser, V. R. *et al.* Ocorrência de leveduras do gênero *Candida* em urina de pacientes diabéticos no Hospital Universitário de Santa Catarina. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 30(01):22-24, 1998.
- 16 Seelig, M. S. The role of antibiotics in the pathogenesis of *Candida* infection. *Amer. J. Med.* 40:887-917, 1996.
- 17 Sidrim, J. J. C. Micoses oportunistas. In: Sidrim, J. J. C.; Moreira, J. L. B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Cap. 15, p.171-190. 1999.
- 18 Sydney, A. H.; Loiva, T.; Oliveira, O. *et al.* A importância da *Candida dublinensis* no diagnóstico laboratorial nas micoses oportunistas. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 32(02):65-68, 2000.
- 19 Vazquez, J. A.; Sanchez, V.; Dmchowski, C. *et al.* Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. *J. Infect. Dis.* 168(01):195-201, 1993.

Endereço para correspondência:

Profª Iolanda Beserra da Costa Santos  
Rua José Jardim, 373 - Bairro dos Ipês - João Pessoa - PB - 58.028-160  
Tel. (0xx83)224-4661 - Telefax (0xx83)226-5265  
E-mail: santos@openline.com.br

# Efeito de naringenina e fruta-de-lobo no diabetes

## Naringenin and wolf fruit effects in diabetes

Tânia Toledo de Oliveira<sup>1\*</sup>; Selma Coelho Liberato<sup>1</sup>; Tanus Jorge Nagem<sup>2</sup>; Aloisio da Silva Pinto<sup>3</sup>; Neuza Maria de Magalhães<sup>1</sup>; Ednaldo Queiroga de Lima<sup>4</sup>; Neuza Maria Costa Brunoro<sup>5</sup>; Josefina Bressan<sup>5</sup>; Marcelo Rocha da Costa<sup>6</sup>; Rosimar Regina da Silva<sup>1</sup> & Maria Aparecida Leão<sup>1</sup>

**RESUMO** – O presente trabalho objetiva avaliar o efeito do amido da fruta-de-lobo e do flavonóide naringenina em coelhos com diabetes induzido por aloxano. Os resultados evidenciaram um aumento estatisticamente significativo no peso de todos os grupos avaliados, sendo maior no grupo controle. Os níveis de colesterol, triacilgliceróis e glicose elevaram-se significativamente no grupo tratado com aloxano em relação ao controle. O grupo tratado com naringenina e fruta-de-lobo apresentaram uma redução estatisticamente significativa nas concentrações sanguíneas de colesterol e triacilgliceróis evidenciando a eficácia de suas ações como hipolipidêmicas. A redução dos níveis de glicose sanguínea de 16,5%, embora não significativa, mostrou-se importante no grupo de animais tratados com naringenina.

**PALAVRAS-CHAVE** – Naringenina, fruta-de-lobo, diabetes.

**SUMMARY** – The present work evaluates the effect of the wolf fruit and flavonoid naringenin in diabetes rabbits induced by aloxan. The results evidenced a statistically significant increase in the weight of all animal groups, being larger in the control group. The cholesterol levels, triacilglycerols and glyucose increased in the alloxan's group relation to the control. The group treated with naringenin and wolf fruit presented a reduction of cholesterol and triacilglycerols in the blood serum showing an effective action as hypolipidaemic. The reduction of glucose level of 16.5% in the group treated with naringenin, even not statistically significant is important.

**KEYWORDS** – Naringenin, wolf fruit, diabetes.

## INTRODUÇÃO

O diabetes acomete, no Brasil, 10% da população adulta. Constitui um conjunto de desordens metabólicas resultantes da insuficiência de insulina ou de fatores que interferem na ação desse hormônio, que se inicia pela sua ligação aos receptores, constituídos de glicoproteínas, e localizados nas membranas plasmáticas das células (Smith *et al.*, 1988). A insulina estimula o transporte de glicose para dentro dos tecidos muscular e adiposo, por promover a translocação de transportadores de glicose (glicoproteínas) intracelulares para a membrana. Tal efeito é reversível. Os transportadores retornam para o interior celular após a liberação da insulina. A fosforilação da glicose garante sua difusão facilitada para dentro das células (Davis, Granner, 1996).

A ligação da insulina aos seus receptores tirosina quinase na membrana celular estimula a atividade de proteína quinase, intrínseca ao próprio receptor, específica para resíduos de tirosina (Sorenson *et al.*, 1994; Marzzoco, Torres, 1999). O passo seguinte consiste na autofosforilação do receptor, que fica ativado desencadeando a fosforilação de vários substratos intracelulares (Kahn, 1998). Os substratos mais estudados são

proteínas de alto peso molecular, substrato-receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). Essas proteínas fosforiladas servem como sítios de ligação e ativação de outras proteínas intracelulares contendo domínio SH<sub>2</sub> (White, Kahn, 1994; Kahn, 1998). Em alguns pacientes com diabetes tipo 2, a expressão do gene Rad que codifica a proteína Ras, que inibe a captação de glicose estimulada por insulina, é elevada no músculo esquelético (Kahn, 1998).

Para a convivência com essa doença, há necessidade de um rigoroso controle da glicemia, uma vez que ainda não se conhece a sua cura (Ensminger *et al.*, 1994).

Mais de 400 espécies vegetais têm sido citadas como benéficas no controle do diabetes (Gray, Flatt, 1999). A forrageira *Solanum lycocarpum*, vulgarmente conhecida como fruta-de-lobo, é uma planta daninha, com uso medicinal (Brandão *et al.*, 1985). Fitoterápicos à base de frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hills tem sido amplamente utilizados no controle do diabetes, da obesidade e do nível de colesterol sanguíneo (Dall'agnol, Poser, 2000). Entretanto, esses fitoterápicos apresentaram efeito tóxico no sistema reprodutivo masculino, com possível atividade antian-drogênica, em camundongos tratados com 60 mg (Sá *et al.*, 2000). Embora o nível de flavonóides não tenha

Recebido em 14/02/2002

Aprovado em 25/02/2002

<sup>1</sup>Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais; <sup>2</sup>Depto. de Química, Universidade Federal de Ouro Preto;

<sup>3</sup>Depto. de Veterinária, Univ. Federal de Viçosa, Minas Gerais; <sup>4</sup>Depto. de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Univ. Federal do Paraíba;

<sup>5</sup>Depto. de Nutrição, Univ. Federal de Viçosa; <sup>6</sup>Graduação em Medicina – Univ. Federal de Minas Gerais.

sido determinado em *S. lycocarpum*, seu fruto contém 0,26% de solasodina (Kerber *et al.*, 1996, citados por Dall'agnol, Poser, 2000). Os flavonóis são predominantes, porém as flavonas são mais amplamente encontradas na subclasse *Androcercas* que em outras *Solanaceae* (Whalen, Mabry, 1979). De 23 vegetais analisados, *S. tuberosum* (batata) foi o que apresentou menor conteúdo de fenóis, menor nível de flavonóides livres e totais e, ainda assim, foi o segundo melhor em qualidade de antioxidantes, baseado nos fenóis totais. Os vegetais tiveram uma qualidade antioxidante comparável a dos flavonóides puros e foram superiores para as vitaminas antioxidantes (Vinson *et al.*, 1998). Dentre os polifenóis de *Solanum* spp., são encontrados antocianinas, cumarinas, derivados do ácido cinâmico, além de quercetina e rutina, e alguns flavonóis glicosilados como kaempferol, miricetina e luteolina (Harborne, 1962).

Os flavonóides são um grande grupo de compostos polifenólicos de origem vegetal, responsáveis por diferentes efeitos biológicos, tais como: antibacteriano, antiviral, antiinflamatório, antialérgico, com ações vasodilatadoras, de inibição da peroxidação de lipídios, de agregação plaquetária, e diminuição da permeabilidade capilar e sobre a atividade de algumas enzimas, como a ciclo-oxigenase e a lipoxigenase (Hertog *et al.*, 1995). Os flavonóides são promissores fármacos naturais. A aplicação do antiinflamatório Daflon 500<sup>®</sup>, um medicamento contendo uma fração de flavonóides purificados, (90% de diosmina e 10% de hesperidina) reduziu a hiperglicemia em ratos diabéticos (Jean, Bodinier, 1994). Os flavonóides agem inibindo várias enzimas como: hidrolases ( $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase), lipases e fosfodiesterases), liases (DOPA descarboxilase), transferases (catecol O-metiltransferase), hidroxilases (arilidroxilase), oxirredutases (aldose redutase) e quinase (hexoquinases) (Havsteen, 1983) e exercem efeitos como antioxidante, quelantes de cátions divalentes e carreadores de radicais livres (Hertog *et al.*, 1995). Altas concentrações plasmáticas de isoflavonóides foram encontrados em humanos vivendo em regiões com baixa incidência de câncer e doenças cardíacas (Mazur *et al.*, 1998). Pesquisas têm demonstrado que alguns flavonóides como por exemplo a genisteína têm efeito como potente inibidor de tirosina quinase aumentando a liberação de insulina (Sorenson *et al.*, 1994). Outro pesquisadores como Drake & Posner, 1998 sugerem que as proteínas tirosinas fosfatases, mais que as proteínas tirosinas quinases, desempenham um papel crítico na regulação da ação da insulina. A genisteína tem mostrado ação ativadora daquelas proteínas estimulando a secreção de insulina.

Há mais de dez anos temos pesquisado sobre a farmacologia e toxicologia de flavonóides de origem natural e sintéticos. Sendo a naringenina encontrada em frutos cítricos e com potencial farmacológico para diversas desordens, optou-se por testá-la junto com amido de fruta-de-lobo que também contera flavonóides.

Considerando a potencialidade dos vegetais de apresentar efeitos terapêuticos no controle da glicemia, bem como os compostos flavonóides, foi desenvolvido o presente trabalho que objetivou avaliar o efeito do amido da fruta-de-lobo e naringenina em coelhos com diabetes induzido por aloxano.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi realizado a extração do amido da fruta-de-lobo, que seguiu as seguintes etapas: higienização, trituração, despulpamento, suspensão em água + amido, decantação por 24 horas em temperatura ambiente e secagem ao sol, resultando em frações escura e clara. Esta última fração tem sido utilizada por pessoas no controle da diabetes. Sua composição é 0,34% de proteínas, 0,08% de lipídios, 14,96% de umidade, 0,03% de cinzas e 94,31% de amido (Marciano, 1997). Este amido foi utilizado no ensaio biológico, preparado em nosso laboratório, e o vegetal foi colhido em casas de vegetação na própria UFV.

Em nossas pesquisas temos trabalhado com diversas espécies de animais e todas as buscas tem que envolver várias espécies tanto na farmacologia quanto na toxicologia. Os experimentos foram conduzidos, utilizando-se coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia, mantidos em gaiolas individuais em temperatura ambiente que receberam água à vontade e 125 g/dia de ração Coelhil R<sup>®</sup>, Socil Guyomarc H Ind. e Com. Ltda. Após jejum de 12 horas, todos os coelhos foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (20 mg/kg) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-diidro-4H-1,3-tiazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal.

Visando determinar a dose ideal de aloxano para indução de diabetes em coelhos, utilizaram-se coelhos, com peso variando entre 1,1 a 1,8 kg. Os tratamentos constituíram de 5 doses de aloxano (90, 105, 120, 135 e 150 mg/kg) e um grupo controle com 8 repetições. Cerca de 30 minutos após a indução da anestesia, o aloxano (Sigma<sup>®</sup>) suspenso em NaCl 0,9%, foi aplicado na veia marginal da orelha dos animais. Quatro dias após a aplicação do aloxano, determinaram-se os níveis sanguíneos de glicose. Os coelhos foram pesados um dia antes e 6 dias após a aplicação do aloxano. O volume máximo da suspensão de aloxano injetado nos coelhos foi de 2 mL. Selecionou-se a dose de 100mg/kg para indução de diabetes, levando em consideração a dose que fosse capaz de induzir a diabetes causando menor índice de mortalidade. Em todos os coelhos, excetuando-se os do grupo controle foi administrado 10 mL de glicose Sigma<sup>®</sup> p.a. 50% (p/v), via intraperitoneal, 4, 8 e 12 horas após a administração do aloxano, para evitar hipoglicemia. Foram considerados diabéticos os coelhos que apresentaram glicemia igual ou superior a 180 mg/dL, acompanhada de sintomas característicos de diabetes como poliúria, polidipsia, menor ganho, ou mesmo perda de peso.

Para as determinações de glicose, coletou-se 5 mL de sangue de cada animal, através do plexo venoso retro-orbital. O sangue foi centrifugado a 7100 x g por 15 minutos e a glicose foi quantificada no analisador multiparamétrico automático Alizé<sup>®</sup>.

A seguir, realizou-se outro experimento, adotando os mesmos procedimentos anteriores, utilizando a dose selecionada de 100mg/Kg de aloxano. Após 5 dias da aplicação do aloxano, foram selecionados os coelhos normais e os diabéticos, que passaram a receber, diariamente, os tratamentos abaixo: Grupo 1-(Ração), Grupo 2-(Ração + aloxano), Grupo 3-(Ração + aloxano + cápsula de 20 mg de naringenina) e Grupo 4-(Ração + aloxano + cápsula de 40 mg de farinha de fruta-de-lobo -Pó que foi preparada em cápsulas). Os níveis sanguíneos de colesterol, triacilgliceróis e gli-

cose foram quantificados no analisador multiparamétrico automático Alizé, bem como o peso dos animais, determinados no primeiro e aos 27 dias. As análises estatísticas foram realizadas com os delineamentos inteiramente casualizados. Utilizou-se teste t (para confrontar médias e verificar se a estimativa diferia significativamente de zero) e correlação momento produto de Pearson que é uma medida do grau de correlação entre duas variáveis. O coeficiente de correlação varia entre -1 e +1. Se r assume o valor 1, diz-se que as duas variáveis têm correlação perfeita positiva e se r assume o valor -1, diz-se que as duas variáveis têm correlação perfeita negativa. Se r assume o valor zero, não existe correlação entre as duas variáveis (a correlação é nula).

Todas análises estatísticas foram processadas com o programa "Statistica for Windows 5.5" (Statsoft, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela I apresenta os resultados de peso e concentrações sanguíneas de colesterol, triacilgliceróis e glicose em coelhos normais e diabéticos que receberam ou não naringenina e fruta-de-lobo obtidos nos dias 1 e 27 do experimento.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada variável, pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

Verifica-se, em relação ao peso, aumento estatisticamente significativo em todos os grupos durante o período avaliado, sendo este aumento percentualmente maior no grupo controle, que recebeu apenas ração. A diminuição relativa no ganho de peso observada nos outros grupos é sintomático, visto que é uma característica dos animais que se encontram diabéticos.

Os níveis de colesterol, triacilgliceróis e glicose elevaram-se significativamente quando se compara o grupo tratado com aloxano (G2) e o grupo controle (G1), que recebeu apenas ração.

Quando se analisa os resultados, considerando o início e o término do experimento dentro do mesmo grupo, observa-se que os grupos de animais diabéticos tratados com naringenina (G3) e fruta-de-lobo (G4) tiveram uma redução estatisticamente significativa nas concentrações sanguíneas de colesterol e triacilgliceróis, evidenciando a eficácia de suas ações farmacológicas como hipolipidêmicas. Estes resultados são importantes uma vez que os indivíduos diabéticos, têm concentrações séricas de triacilgliceróis elevadas, e isto também leva à produção de maiores concentrações de glicerol-fosfato que é utilizado pelos animais e humanos para a síntese de triacilgliceróis. A glicose sanguínea atravessa a parede capilar e na célula adiposa produz glicose-6-fosfato que produz dihidroxia cetona fosfato. Esta por sua vez produz acetil coA e  $\alpha$ -glicerofosfato. Esse último produzirá triacilgliceróis (Devlin, 1997).

A redução dos níveis de glicose sanguínea no grupo de animais tratados com naringenina foi de 16,05%, correspondendo a um valor de 78,3 mg/dL no período de 27 dias. Levando-se em conta o efeito farmacológico, esta variação em um indivíduo diabético, neste período de tempo, se mostra altamente relevante. É importante lembrar, ainda, que o paciente diabético faz uso rotineiramente de medicamentos hipoglicemiantes e por períodos prolongados e, portanto, este efeito da naringenina poderá ser substancialmente maior ao

**TABELA I**  
**Peso (g) e concentrações dos constituintes sanguíneos (mg/dL) em coelhos testemunhas e que receberam naringenina ou farinha de fruta-de-lobo**

Parâmetros	Dias	Grupo 1- (Ração)	Grupo 2- (Ração + Aloxano)	Grupo 3- (Ração+ Aloxano + Naringenina)	Grupo 4- (Ração + Aloxano + Fruta-de-Lobo)
Peso	1	1470,0 b	1516,0 b	1328,3 b	1374,0 b
	27	2206,9 a	1861,0 a	1736,7 a	1623,0 a
Colesterol	1	128,2 a	424,4 a	418,3 a	353,1 a
	27	111,4 a	383,9 a	112,3 b	75,7 b
Triacilgliceróis	1	225,9 a	507,5 a	571,3 a	525,3 a
	27	182,3 a	533,5 a	125,9 b	152,6 b
Glicose	1	127,1 a	508,9 a	487,7 a	507,4 a
	27	137,0 a	506,0 a	409,4 b	497,6 a

**TABELA II**  
**Correlação momento-produto de Pearson<sup>1</sup> entre peso e constituintes sanguíneos de coelhos ao final do experimento**

	Peso	Colesterol	Triacilgliceróis	Glicose
Peso	—	0,35	-0,44	-0,27
Colesterol	0,70	—	-0,20	-0,43
Triacilgliceróis	-0,88*	-0,42	—	0,77*
Glicose	-0,85	-0,25	0,82	—

\* $P < 0,05$ .

<sup>1</sup>A diagonal superior expressa a correlação baseada em 8 coelhos testemunhas normais e a diagonal inferior, em 5 coelhos testemunhas diabéticos.

longo do tratamento. Novos estudos deverão ser realizados com doses maiores, durante períodos longos para permitir uma redução maior desse flavonóide.

As correlações entre peso e constituintes sanguíneos são apresentadas na Tabela II.

De acordo com os resultados, o valor de -0,88 que correlaciona triacilglicerol x peso demonstrou que o valor obtido de r foi mais próximo de -1, o que significa uma correlação negativa. Estes resultados estão de acordo com o esperado, visto que nos diabéticos há perda de peso com aumento de triacilglicerol. Por outro lado, o valor que correlaciona triacilglicerol x glicose, que foi de + 0,77, demonstrando que o valor de r foi mais próximo de +1, expressando, assim, uma correlação positiva. Isto está justificado, tendo em vista que nos indivíduos diabéticos há aumento da concentração de glicose e ao mesmo tempo de triacilglicerol. As demais correlações não foram significativas.

Em muitos estudos sobre diabetes, com duração de várias semanas ou até meses, são utilizados animais cobaias, nos quais é induzido diabetes. Assim, ao ser aplicado aloxano, deve-se utilizar dose que seja suficiente para induzir o diabetes, mas não seja tão alta que possa matar os animais. A destruição da maioria das células  $\beta$  do pâncreas que secretam insulina produz alterações complexas e interrelacionadas com a bioquímica de carboidratos, lipídios e proteínas, equivalentes àquelas observadas no diabetes tipo 1 de humanos (Cacini *et al.*, 1993).

Zhao *et al.* (1987) também observou grande variabilidade quanto aos efeitos diabetogênicos do aloxano aplicado em coelhos. Uma possível explicação seria que uma mesma dose de aloxano pode ser suficiente para destruir grande número das células  $\beta$  do pâncreas, ou mesmo todas, em um animal, induzindo assim a hiperglicemia, ou à morte.

O aloxano age especificamente nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, mais precisamente em sua membrana plasmática (Gorray *et al.*, 1983), induzindo inicialmente maciça liberação de insulina, cuja taxa posteriormente é reduzida abaixo dos níveis normais, o que irá acarretar hiperglicemia, que em coelhos, pode ocorrer dentro de 48 horas após a aplicação do aloxano (Witmer *et al.*, 1992). Essa alta taxa inicial de liberação de insulina pode causar hipoglicemia fatal (Gorray *et al.*, 1983; Bhimji, Mcneill, 1989). Para evitá-la é comum a administração de glicose nas primeiras 24 horas após a aplicação do aloxano. Segundo Bhimji, Mcneill (1989), essa medida pode reduzir a mortalidade de 100% para menos de 10%.

Sundaram *et al.* (1996) também não detectaram diferença significativa entre os tratamentos, embora tenham observado reduções substanciais na glicemia em coelhos diabéticos, usando formulações contendo plantas medicinais e preparações minerais com ação hipoglicemiante adicionada aos hipoglicemiantes orais, tolbutamida ou glibenzamida.

Segundo Dall'agnol, Poser (2000), a fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum*) possui efeito hipoglicemiante, atribuído ao conteúdo de polissacarídeos de seu fruto, que além de retardarem o esvaziamento gástrico e, conseqüentemente, a absorção de glicose e outros metabólitos para a corrente sanguínea, também agem em sistemas endócrinos afetando a liberação de hormônios gastrointestinais e reduzindo os níveis plasmáticos de glicose. Um outro fator que pode estar envolvido no efeito hipoglicemiante do amido da fruta-de-lobo é a presença de um glicosídeo terpenóide, responsável pelo aumento da utilização de glicose (Marciano, 1997).

Marciano (1997) observou que, quanto maior a porcentagem de amido de fruta-de-lobo na dieta de ratos, menor foi o ganho de peso. Sá *et al.* (2000) não observaram alteração de peso em ratos ou camundongos, recebendo fruta-de-lobo, embora tenham observado perda de peso na próstata de camundongos e, devido a isso, sugeriram a ocorrência de efeito tóxico no sistema reprodutor masculino.

O colesterol, um esteroide produzido principalmente no fígado a partir do acetato, é transformado em ácidos biliares que são eliminados na bile. Cerca de 95% destes ácidos são reabsorvidos no intestino delgado, voltando ao fígado. Essa circulação entero-hepática parece controlar a produção de colesterol por meio de um mecanismo de auto-regulação negativa. O colesterol total é constituído de colesterol livre e esterificado, com ácidos graxos (Miller, 1986). Em humanos, os valores normais de colesterol total, no sangue, variam entre 150 a 250 mg.dL<sup>-1</sup>. Nos diabéticos, os níveis são elevados, podendo chegar a 3600 mg.dL<sup>-1</sup> (Lima, 1985). Em coelhos, há registros dos níveis de colesterol em normais e diabéticos de  $71 \pm 6$  e  $227 \pm 27$  mg.dL<sup>-1</sup> (média  $\pm$  erro-padrão), respectivamente (Bhimji, Mcneill, 1989).

Os níveis de triacilgliceróis, ésteres de ácidos graxos com glicerol, em humanos normais, variam de 50 a 150 mg.dL<sup>-1</sup>, sendo maiores nos diabéticos (Lima, 1985). Em coelhos normais e diabéticos são de  $55 \pm 6$  e  $179 \pm 14$  mg.dL<sup>-1</sup> (média  $\pm$  erro-padrão), respectivamente (Bhimji, Mcneill, 1989).

Níveis de triacilgliceróis plasmáticos variando de 100 a 5500 mg.dL<sup>-1</sup> foram observados em coelhos que

receberam a mesma quantidade de aloxano. Em coelhos diabéticos, os níveis de colesterol e triacilgliceróis foram aproximadamente 3000 e 500 a 7500 mg.dL<sup>-1</sup>, respectivamente, após 3 a 4 semanas com dietas contendo esses constituintes (Minnich, Zilversmit, 1989).

Bhimji, Mcneill (1989) constataram que todos coelhos diabéticos tiveram elevações significativas nos níveis de colesterol e triacilgliceróis.

Kurowska *et al.* (1997) verificaram que coelhos hipercolesterolêmicos recebendo suco de laranja ou uva, que representam importantes fontes de naringenina, tiveram níveis de colesterol-LDL menores (43 e 32%, respectivamente) que os controles.

A secreção de insulina é regulada por diferentes mecanismos, sendo que o mais importante depende da concentração intracelular de Ca<sup>++</sup>. O cálcio é utilizado como sinalizador intracelular, ativando uma série de reações que irão culminar com a secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas (Alberts *et al.*, 1997). O metabolismo da glicose, iniciado pela glicocinase, resulta em modificação na proporção ATP/ADP, que causa inibição dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP e despolarização da célula. Isto resulta na ativação compensatória dos canais de Ca<sup>++</sup> dependente da voltagem, e conseqüentemente, aumento do influxo de Ca<sup>++</sup> para dentro da célula  $\beta$ , o qual ativa a fosfolipase A e a fosfolipase C, que provocam formação de ácido araquidônico, inositol-polifosfatos e diacilglicerol. Este mobiliza Ca<sup>++</sup> a partir do retículo endoplasmático, elevando ainda mais a concentração citossólica desse cátion, que atua como o secretagogo da insulina (DAVIS & GRANNER, 1996). O Ca<sup>++</sup> é bombeado ativamente para fora da célula, pela Ca<sup>++</sup>ATPase presente na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (Alberts *et al.*, 1997). Os flavonóides quercetina e, em menor extensão, o fletetina, inibiram a atividade Ca<sup>++</sup>-ATPase da membrana cerebral, sinaptossomal (Grosman, 1998).

O acúmulo de cálcio no citossol promove a ativação de uma proteína quinase, dependente de cálcio, chamada proteína quinase C, que parece estar diretamente envolvida nos processos de secreção de insulina. Esta proteína quinase C ativaria uma cascata de fosforilações, que induziria à ativação de proteínas reguladoras, que aumentariam a transcrição de genes que codificam a insulina (Alberts *et al.*, 1997; Marzocco, Torres, 1999).

Outra hipótese de regulação da secreção da insulina seria a ativação da proteína quinase A por meio do acúmulo de cAMP, no citosol. Esta enzima, por sua vez, ativaria uma cascata de fosforilações, culminando com a transcrição de genes específicos para a insulina (Alberts *et al.*, 1997).

Outro mecanismo de regulação da secreção de insulina, envolvendo tirosinas quinase, também foi observado quando a genisteína, um inibidor de tirosina quinase aumentou a liberação de insulina (Sorenson *et al.*, 1994). Drake, Posner (1998) sugerindo que as proteínas tirosinas fosfatases, mais que as proteínas tirosinas quinases, desempenhassem um papel crítico na regulação da ação da insulina. A genisteína tem mostrado ação ativadora daquelas proteínas, estimulando a secreção de insulina.

Em camundongos, a genisteína provocou um aumento, reversível e dependente da concentração, da liberação de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas,

apesar da redução das concentrações de cálcio nessas células. Esse aumento cessa na presença de adrena-lina ou omissão do cálcio extracelular e não foi acom-panhado por qualquer aumento nas concentrações de cAMP, inositol fosfato ou adenina nucleotídeo. A daidzeína, um análogo da genisteína, não afetou as tirosinas quinases e foi sensivelmente menos potente nos canais de  $Ca^{++}$  e  $K^{+}$ , mas aumentou a secreção de insulina de maneira similar (Jonas *et al.*, 1995). Ex-trato de folhas de *Bridelia ferruginea*, contendo ruti-na reduziu a glicemia de coelhos normais em 40% (Onunkwo *et al.*, 1996).

## CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que diversos meca-nismos podem ser propostos para justificar os efeitos hipolipidêmico e hipoglicêmico dos flavonóides. A naringenina, nas condições experimentais deste tra-balho, apresentou redução da concentração de glicose sanguínea nos animais diabéticos induzidos por alo-xano. O tratamento com a fruta-de-lobo, no entanto, não apresentou este efeito, que foi demonstrado por outros autores. Com relação ao colesterol e triacilgli-ceróis, os tratamentos com naringenina, bem como a fruta-de-lobo causaram redução estatisticamente sig-nificativa. Estes resultados indicam a necessidade de prosseguir a busca de substâncias com ações hipolipi-dêmicas e hipoglicêmicas, que possam futuramente serem utilizadas na terapia medicamentosa destas patologias.

## AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar seus agradecimentos à FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Es-tado de Minas Gerais e ao CNPq- Conselho Nacional de Pesquisas pelo apoio financeiro e bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

1. **Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D.** *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1294p. 1997.
2. **Bhimji, S.; McNeill, J. H.** Isoproterenol-induced ultrastructural alterations in hearts of alloxan-diabetic rabbits. *General Pharmacology*, England, v.20, n.4, p.479-485, 1989.
3. **Brandão, M.; Buendia, J. P. L.; Gavilanes, M. L.; Zurlo, M. A.; Cunha, L. H. S.; Cardoso, C.** Novos enfoques para plantas consideradas daninhas. *Informe Agropecuário*, Brasil, v.11, n.129, p.3-12, 1985.
4. **Cacini, W.; Harden, E. A.; Skau, K. A.** Reduced renal accumulation and toxicity of cisplatin in experimental galactosemia. *Proceedings of the National Academy Science United State of American*, v.203, p.348-353, 1993.
5. **Dall'agnol, R.; Poser, G. L. V.** The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the *Solanum lycocarpum* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, England, v.71, p.337-341, 2000.
6. **Davis, S. N.; Granner, D. K.** Insulina, fármacos hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: **Hardman, J. G. Limbird, L. E.** *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996.
7. **Drake, P. G.; Posner, B. I.** Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase (s): role in insulin action. *Molecular and Cellular Biochemistry*, USA, v.182, n.1-2, p.79-89, 1998.
8. **Devlin, T. M.** Textbook of biochemistry with clinical correlations. Ed Willey Liss Inc., New York, 1186p., 1997.
9. **Ensminger, A. H.; Ensminger, M. E.; Konlande, J. F. et al.** *Diabetes mellitus: foods and nutrition encyclopedia*. London: RCC, p.555-575, 1994.
10. **Formica, J. V.; Regelson, W.** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food & Chemical Toxicol.*, USA, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.
11. **Gorray, K. C.; Baskin, D.; Fujimoto, W. Y.** Cytotoxic effects of alloxan treatment in vitro on monolayer cultures of neonatal rat pancreas. *American Journal of Physiology, California*. v.245, p.E417-E423, 1983.

12. **Gray, A. M.; Flatt, P. R.** Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). *British Journal of Nutrition*, England, v.81, p.203-209, 1999.
13. **Grossman, N.** Influence of probes for calcium-calmodulin and protein kinase C signalling on the plasma membrane  $Ca^{++}$ -ATPase activity of rat synapto-somes and leukocyte membranes. *Immunopharmacology, USA*, v.40, p.163-171, 1998.
14. **Harborne, J. B.** Plant polyphenols. 6. The flavonol glycosides of wild and cultivated potatoes. *The Journal of Biochemistry*, USA, v.84, p.100-106, 1962.
15. **Havsteen, B.** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, England, v.32, n.7, p.1141-1148, 1983.
16. **Hertog, M. G. L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B. S.; Toshima, H.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.** Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, England, v.155, n.4, p.381-386, 1995.
17. **Jean, T.; Bodinier, M. C.** Mediators involved in inflammation: effects of Daflon 500mg on their release. *Angiology*, USA, v.45, n.6, Pte. 2, p.554-559, 1994.
18. **Jonas, J. C.; Plant, T. D.; Gilon, P.; Detimary, P.; Nenquin, M.; Henquin, J. C.** Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets. *British Journal of Pharmacology*, England, v.114, n.4, p.872-880, 1995.
19. **Kahn, C. R.** Section on cellular and molecular physiology. *Joslin Diabetes Center Research Report*, USA, 1997-98, v.11, n.3, p.17, 1998.
20. **Kurowska, E. M.; Borradaile, N.; Meade, M.; Spence, J. D.; Carroll, K. K.** Cholesterol-lowering effects of dietary citrus juices and their flavonoids. Studies in rats, mice and rabbits. *Atherosclerosis*, USA, v.134, n.1-2, p.330, 1997.
21. **Lima, A. O.** *Métodos de laboratório aplicados à ciência*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 549p. 1985.
22. **Marciano, C.** *Efeito de amido da fruta da lobeira no controle de diabetes mellitus*. Viçosa, MG: UFV, 1997. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, 1997.
23. **Marzocco, A.; Torres, B. B.** *Bioquímica Básica*. 2ª ed. São Paulo: Guanabara, 360p. 1999.
24. **Mazur, W. M.; Duke, J. A.; Wähakä, K.; Rasku, S.; Adlercreutz, H.** Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, USA, v.9, p.193-200, 1998.
25. **Miller, O.** *Laboratório para o clínico*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 549p. 1986.
26. **Minnich, A.; Zilversmit, D. B.** Impaired triacylglycerol catabolism in hypertriglyceridemia of the diabetic, cholesterol-fed rabbit: a possible mechanism for protection from atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, USA, v.26, n.1002, Pte.3, p.324-332, 1989.
27. **Onunkwo, G. C.; Akah, P. A.; Udeala, O. K.** Studies on *Bridelia ferruginea* leaves. Stability and hypoglycaemic actions of leaf extract tablets. *Phytotherapy Research*, England, v.10, p.418-420, 1996.
28. **Park, B. H.; Rho, H. W.; Park, J. W.; Cho, C. G.; Kim, J. S.; Chung, H. T.; Kim, H. R.** Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, USA, v.5, n.210, Pte.1, p.1-6, 1995.
29. **Sá, R. D. D. E.; Vireque, A. A.; Reis, J. E. D.; Guerra, M. D.** Evaluation of the toxicity of *Solanum lycocarpum* in the reproductive system of male mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, England, v.73, n.1-2, p.283-287, 2000.
30. **Smith, E. L.; Hill, R. L.; Lehman, I. R. et al.** *Principles of biochemistry: mammalian*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 612p. 1988.
31. **Sorenson, R. L.; Brejle, T. C.; Roth, C.** Effect of tyrosine kinase inhibitors on islet of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinology*, USA, v.134, n.4, p.1975-1978, 1994.
32. **Statsoft, Irc.** *Statistica for windows* [computer program manual]. Tulsa, OK: Statsoft, Irc., 2000. <http://www.statsoft.com>
33. **Vinson, J. A.; Hao, Y.; Su, X.; Zubik, L.** Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Scranton*, v.46, p.3630-3634, 1998.
34. **Whalen, M. D.; Mabry, T. J.** New 8-hydroxyflavonoids from *Solanum* section *Androceras*. *Phytochemistry*, England, v.18, p.263-265, 1979.
35. **White, M.; Kahn, R.** The insulin signaling system. *The Journal of Biological Chemistry*, England, v.269, n.1, p.1-4, 1994.
36. **Witmer, M. R.; Haddock, S. J.; Peltier, S. L.; Winocour, P. D.; Richardson, M.; Hatton, M. W. C.** Altered levels of antithrombin III and fibrinogen in the aortic wall of the alloxan-induced diabetic rabbit: evidence of a prothrombotic state. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, USA, v.119, p.221-230, 1992.
37. **Zhao, Z. H.; Watschinger, B.; Brown, C. D.; Beyer, M. M.; Friedman, E. A.** Variations of susceptibility to alloxan induced diabetes in the rabbit. *Hormone Metabolism Research*, USA, v.19, n.11, p.534-537, 1987.

Endereço para correspondência

Tânus Jorge Nagem

Universidade Federal de Ouro Preto - Departamento de Química  
35400-000 - Ouro Preto - Minas Gerais - Brasil

E-mail: tjnagem.bh@zaz.com.br

# Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* entre pacientes sidéticos do Centro de Saúde de Porto Alegre, RS\*

## Search *Cryptosporidium parvum* oocysts in diarrheic feces from AIDS patients in a state medical unit in Porto Alegre, RS

José R. K. Rodrigues; Sheila B. Lecke; Rafael V. Michel; Tiana Tasca & Geraldo A. De Carli

**RESUMO** – A prevalência de oocistos de *Cryptosporidium parvum* foi determinada em amostras fecais de 25 sidéticos de ambos os sexos com gastroenterite, durante o período de abril a maio de 2002 no Centro de Saúde Vila dos Comerciantes em Porto Alegre, RS. Os oocistos foram detectados pela coloração da safranina modificada a quente. Pelos dados observados das 25 amostras estudadas, 16% (4) apresentaram resultados positivos e 84% (21) foram negativas para a pesquisa de oocistos. No que se refere à ocorrência de oocistos de *C. parvum*, em relação ao sexo, foi verificado que os maiores percentuais de infecção foram obtidos entre as pacientes do sexo feminino 12% (3), enquanto que entre os sidéticos do sexo masculino o índice de infecção foi igual a 4% (1).

**PALAVRAS-CHAVE** – *Cryptosporidium parvum*, oocistos, sidéticos, safranina.

**SUMMARY** – The aim of this study was to search *Cryptosporidium parvum* oocysts in diarrheic feces from 25 AIDS patients in a state medical unit in Porto Alegre, RS. *Cryptosporidium* oocysts were present in 16% (4) patients with prolonged diarrhea. The results show that a small proportion of patients with gastroenteritis are infected with *C. parvum*, and the importance of the infection needs to be examined.

**KEYWORDS** – *Cryptosporidium parvum*, oocysts, AIDS, safranin.

### INTRODUÇÃO

Em 1981 o *Centers for Disease Control* (CDC), EUA, começou a reportar a ocorrência do sarcoma de Kaposi e outras severas infecções oportunistas em jovens homens homossexuais. Numerosos relatos apareceram, todos relacionados com infecções oportunistas e neoplasias, não somente em homossexuais e bissexuais mas, também, em outros grupos de risco. Este quadro patológico foi chamado de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)<sup>1,4</sup>. Entre os agentes oportunistas o coccídio parasito *Cryptosporidium parvum* está associado com doença intestinal e primariamente com pacientes imunodeprimidos. As manifestações da criptosporidiose podem ser agrupadas em dois tipos, dependendo do estado do portador: gastroenterite transitória, em pacientes imunocompetentes, e manifestações persistentes, com sinais e sintomas clínicos marcados em pacientes imunodeprimidos<sup>2,5,7</sup>.

O diagnóstico definitivo da criptosporidiose baseia-se na demonstração dos oocistos nas fezes. Entretanto, inúmeras dificuldades são encontradas na realização desse diagnóstico. Nos indivíduos imunocompetentes os parasitos são identificados nas fezes três dias após a contaminação, e o tempo de emissão é curto (duas ou três semanas), não havendo abundância. Nos pacientes imunodeprimidos, a permanência dos oocistos pode ser indefinida, correspondendo aos períodos de diarreia. Essa diarreia aquosa acarreta a dilui-

ção dos parasitos e a aceleração das evacuações, com presença de muco e de numerosos restos de vegetais que podem mascarar a pesquisa. A emissão dos oocistos é descontínua, sendo necessária a realização de várias colheitas e exames a cada três dias antes de concluir pela ausência do protozoário. Ao contrário dos parasitos, que são raros, as leveduras são, com frequência, abundantes e devem ser diferenciadas do *Cryptosporidium*, que tem o mesmo tamanho<sup>3,5</sup>. Nesse estudo demonstramos a ocorrência de oocistos de *C. parvum* nas fezes de pacientes sidéticos com gastroenterite.

### PACIENTES E MÉTODOS

No presente estudo, foi examinada a prevalência de oocistos de *C. parvum* em amostras fecais colhidas de pacientes adultos sidéticos com gastroenterite no Centro de Saúde Vila dos Comerciantes (CSVC) em Porto Alegre, RS. Os espécimes fecais foram colhidos de pacientes com diarreia prolongada, durante os meses de abril e maio de 2002. As amostras controle de pacientes sem diarreia foram obtidas durante o mesmo período no CSVC. Os espécimes fecais foram preservados em frascos de plástico contendo solução salina de formaldeído a 10%. Somente uma amostra foi colhida de cada paciente. Participaram deste estudo 25 pacientes (11 homens e 14 mulheres) todos portadores da SIDA.

Recebido em 22/7/2002

Aprovado em 23/7/2002

\*Laboratório de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

O método modificado da safranina a quente foi o procedimento usado para a coloração das amostras fecais<sup>3,5</sup>. Foi incluído ao método de coloração uma lâmina controle com oocistos de *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%. Os resultados foram analisados através do teste *t* de Student.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram examinadas 25 amostras fecais não concentradas. Os resultados da pesquisa estão expressos nas Tabelas I e II. Os oocistos de *C. parvum* estavam presentes em 16% (4) dos pacientes com diarreia prolongada. No que se refere à ocorrência de oocistos de *C. parvum*, em relação ao sexo, foi verificado que os maiores percentuais de infecção foram obtidos entre as pacientes do sexo feminino, 12% (3), enquanto que entre os sidéticos do sexo masculino o índice de infecção foi igual a 4% (1). Todas as fezes controle (não diarréicas) foram negativas para oocistos de *Cryptosporidium*. A morfometria com o micrômetro ocular foi indispensável para a identificação dos oocistos<sup>6</sup>.

Devido à curiosa e inexplicável marcada variabilidade de coloração exibida pelos oocistos da *Cyclospora cayetanensis* (9 µm, variando de 8 a 10 µm) quando corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen, optou-se pelo uso do método modificado da safranina a quente para evitar este problema e confirmar a ausência do organismo<sup>3,5</sup>. Esse procedimento mostrou ser eficiente para a pesquisa de *C. parvum*. Os oocistos apareceram arredondados corados em um brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo uniformemente corado em verde<sup>3</sup>. Os oocistos apresentaram uma estrutura geralmente esférica de 3 a 6 µm de diâmetro (média 4 a 5 µm), com membrana externa fina e citoplasma finamente granulado. Esporozoítos livres apareceram como pequenas manchas dispostas na periferia em forma de "C".

Sumarizando, os oocistos de *C. parvum* são facilmente detectados em fezes frescas e/ou preservadas quando coradas pelo método modificado da safranina à quente.

TABELA I

Prevalência de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em 25 pacientes sidéticos do Posto de Saúde da Vila dos Comerciantes, Porto Alegre, RS, em 2002

Nº de amostras examinadas	Amostras positivas	Amostras negativas
25	4	21
(100%)	(16%)	(84%)

TABELA II

Prevalência de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, em relação ao sexo, em 25 pacientes sidéticos do Posto de Saúde da Vila dos Comerciantes, Porto Alegre, RS, em 2002

Nº de amostras positivas	Homens	Mulheres
4	1	3
(16%)	(4%)	(12%)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centers for Disease Control. Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia* among homosexual men - New York and California. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 30: 305-308, 1981.
2. Current, W. L. Human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 309:1326-1327, 1983.
3. De Carli, G. A. *Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. Editora Atheneu, São Paulo, 2001.
4. Garcia, L. S.; Bruckner, D. A.; Brewer, T. C. & Shimizu, R. Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18: 185-190, 1983.
5. Garcia, L. S. *Diagnostic medical parasitology*. 4th ed. ASM Press, Washington, D.C., 2001.
6. González-Ruiz, A. & Bendall, R. P. Size matters: the use of the ocular micrometer in diagnostic parasitology. *Parasitol. Today*. 11:83-85, 1995.
7. Ma, P. *Cryptosporidium* - biology and diagnosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 202:135, 1986.

Endereço para correspondência

Prof. Geraldo Attilio De Carli  
Av. Cel. Lucas de Oliveira, 597/302  
Mont'Serrat 90440-011 Porto Alegre, RS  
Fax (0xx51)3332-2582  
E-mail: gdecarli@portoweb.com.br

## Seminários de Atualização Científica promovidos pela SBAC

Micologia Clínica - Prático - Parte II

30 de agosto de 2002

Prof. Dr. Paulo Neufeld (UFRJ)

Discussão de casos clínicos em Leucemias

27 de setembro de 2002

Prof. Dr. Marcos K. Fleury (UFRJ)

Imunologia das Hepatites

25 de outubro de 2002

Prof. Silvio Roberto Foletto

Informações

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Rua Vicente Licínio, 95, Tijuca - Rio de Janeiro, RJ - 20270-902

Tel. (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2204-0245

Home page: www.sbac.org.br • E-mail: geral@sbac.org.br

# Citrato urinário na nefrolitíase\*

## Urinary citrate in nephrolithiasis

Marlene Leiko Doi Sakuno<sup>1</sup>; Gisele Takahachi<sup>2</sup>; Ana Beatriz Tozzo Martins<sup>3</sup>; Vanderly Janeiro<sup>3</sup>; Regiane Bofetti<sup>4</sup>; Eliane Kiyomi Tabuti<sup>4</sup> & Tatiana Moreno Barbieri<sup>4</sup>

**RESUMO** – O citrato tem dois efeitos importantes na prevenção da nefrolitíase conhecidos como efeitos solubilizante e inibidor da cristalização dos sais de cálcio. É um ácido tricarbóxico que faz parte do ciclo de Krebs, sendo livremente filtrado e excretado pelos rins. A sua excreção pela urina pode sofrer influência de vários fatores, tais como a idade, o sexo, o conteúdo de ácido cítrico, proteínas e sódio na dieta, a atividade física, o equilíbrio ácido-básico, etc. Este trabalho tem como objetivo verificar a influência do sexo e da idade na excreção de citrato pela urina em pacientes com nefrolitíase. Para tal, realizamos a medida de citrato na urina de 24 horas (método enzimático) em 98 indivíduos do sexo masculino ( $36 \pm 13,5$  anos) e 124 do sexo feminino ( $36 \pm 12,7$  anos), todos com cálculo renal. Verificamos que o sexo influenciou significativamente na excreção urinária de citrato, com as mulheres excretando mais ( $527 \pm 225$  mg/24 horas) do que os homens ( $409 \pm 210$  mg/24 horas) ( $p=0,0001$ ). A prevalência de hipocitraturia foi bem maior nos homens (41%) do que nas mulheres (18%). Quando os 2 grupos (sexo masculino e feminino) foram separados de acordo com a idade observamos que, até os 40 anos, as mulheres excretaram mais citrato do que os homens. Se considerarmos somente o fator idade verificamos que homens até 20 anos apresentaram valores de citrato significativamente menores do que aqueles com idade acima de 20. Já nas mulheres, a excreção de citrato pela urina não foi estatisticamente diferente nas categorias de idade estudadas.

**PALAVRAS-CHAVE** – Citrato urinário, nefrolitíase, influência do sexo e da idade.

**SUMMARY** – The citrate has two important effects in the prevention of the nephrolithiasis known as solubilizing effects and inhibitors of calcium crystallization. It is a tricarboxylic acid, part of Krebs cycle, which is filtered freely and excreted by the kidneys. Its excretion by the urine can suffer influence from several factors, such as age, sex, citric acid content, proteins and sodium in the diet, physical activities, acid-base balance, etc. This work has the objective of verifying the influence of the sex and the age in the urinary excretion of citrate in patients with nephrolithiasis. In order to do that, we accomplished the measure of the citrate in 24-hour urine samples (enzymatic method) in 98 male patients ( $36 \pm 13.5$  years) and 124 female patients ( $36 \pm 12.7$  years), all having renal calculus. We verified that the sex influenced significantly in the urinary excretion of citrate: women excreted more ( $527 \pm 225$  mg/24 hours) than men ( $409 \pm 210$  mg/24 hours) ( $p=0.0001$ ). The hypocitraturia prevalence was very larger in the men (41%) than in the women (18%). When the two groups (male and female) were separated in agreement with the age we observed that the women up to 40 years old excreted more citrate than men. If we consider only the factor age we concluded that men up to 20 years old presented citrate values significantly smaller than those with age above 20. Already in the women, the citrate excretion for the urine was not statistically different in the categories of age studied.

**KEYWORDS** – Urinary citrate, nephrolithiasis, influence of sex and age.

## INTRODUÇÃO

O citrato tem dois efeitos importantes na prevenção da nefrolitíase conhecidos como efeitos solubilizante e inibidor da cristalização dos sais de cálcio<sup>12</sup>. É um ácido tricarbóxico que faz parte do ciclo de Krebs, sendo livremente filtrado pelo glomérulo renal. Cerca de 65 a 90% da carga filtrada será reabsorvida pelos túbulos proximais através de um transporte eletrogênico dependente de sódio. O citrato reabsorvido não retorna para a circulação. Juntamente com o citrato que é recapturado do líquido peritubular, acumula-se no citoplasma e é transportado para o interior da mitocôndria onde, através do ciclo de Krebs, é oxidado para CO<sub>2</sub> e água. A quantidade de citrato que é excretada pela urina corresponde à faixa de 10 a 35% do total filtrado que não foi reabsorvido pelos túbulos<sup>7,8</sup>. A sua excreção pela urina pode sofrer influência de vários fatores, tais como a idade, o sexo, o conteúdo de ácido cítrico, proteínas e sódio na dieta, a atividade física, o equilíbrio ácido básico, etc<sup>12</sup>.

Este trabalho tem como objetivo verificar a influência do sexo e da idade na excreção de citrato pela urina em pacientes com nefrolitíase.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Participaram deste estudo 98 indivíduos do sexo masculino com idade entre 4 e 76 anos e 124 do sexo feminino com idade entre 7 e 72 anos, todos com cálculo renal, que procuraram o Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá para a realização do estudo metabólico da litíase renal.

A dosagem de citrato na urina de 24 horas foi realizada utilizando-se um método enzimático que se baseou na transformação do citrato em oxaloacetato pela enzima citrato liase. Posteriormente, na presença de NADH e malato desidrogenase, o oxaloacetato foi reduzido a malato à medida que o NADH foi oxidado a NAD. Este método foi descrito por Moellering & Gru-

Recebido em 8/7/2002

Aprovado em 12/7/2002

\*Trabalho realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), Depto. de Análises Clínicas (DAC), Univ. Est. de Maringá (UEM), PR.

<sup>1</sup>Docente da disciplina de Bioquímica Clínica, DAC, UEM; <sup>2</sup>Farmacêutica, LEPAC, UEM;

<sup>3</sup>Docente do departamento de Estatística, UEM; <sup>4</sup>Acadêmica do curso de Farmácia, UEM.

ber<sup>9</sup> e modificado por Costello & O'Neil<sup>5</sup> e Nielsen<sup>10</sup> e citado por Rebelo & Schor<sup>13</sup>.

Para a análise dos resultados, os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o sexo, sendo que cada grupo foi subdividido em 5 categorias de idade (categoria 0 = < 20 anos; 1 = 21 a 30 anos; 2 = 31 a 40 anos; 3 = 41 a 50 anos; 4 = > 50 anos). As análises estatísticas foram realizadas aplicando-se os testes não paramétricos Lilliefors, Wilcoxon e Kruskal-Wallis<sup>4,15</sup> através dos softwares Excel e SAS e considerando-se um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de ácido cítrico na urina foi demonstrada pela primeira vez em 1917<sup>1</sup>.

Boothby & Adams<sup>3</sup>, em 1934, foram os primeiros a constatar a deficiência de citrato na urina de pacientes com nefrolitíase. No entanto, estes achados não despertaram muita atenção naquela época.

Após a divulgação, por Moellering & Gruber<sup>9</sup>, de um método enzimático para dosagem de citrato com o uso da citrato liase e os conhecimentos obtidos sobre a capacidade do citrato em inibir algumas etapas do processo de cristalização dos sais de cálcio, in vitro, renovou-se o interesse nas dosagens do citrato na prática clínica da nefrolitíase<sup>12</sup>.

Vários fatores podem alterar a excreção de citrato pela urina sendo o equilíbrio ácido-básico considerado o principal regulador. Ostberg<sup>11</sup> foi o primeiro a constatar, in vivo, que a alcalose metabólica aumenta, enquanto a acidose sistêmica diminui a excreção renal de citrato. A acidose metabólica facilita a entrada de citrato na célula renal e aumenta o processo oxidativo na mitocôndria. Isto estimula também a entrada do citrato proveniente do líquido peritubular para a célula renal. A acidose estimula, no líquido tubular renal, a transformação de citrato trivalente em divalente, que é a forma preferida para a reabsorção<sup>2,12</sup>. Através destes mecanismos explica-se a hipocitraturia da acidose sistêmica (metabólica ou respiratória), da insuficiência renal crônica, das síndromes de má absorção intestinal, das alterações eletrolíticas como a hipopotassemia e hipomagnesemia, da acidose tubular distal, do uso crônico de acetazolamida e tiazida. Essas situações cursam com acidose intracelular cortical renal levando a hipocitraturia e maior risco para a nefrolitíase<sup>12</sup>.

A hipocitraturia pode ser eventualmente atribuída à infecção urinária por certos tipos de bactérias que necessitam de citrato para o seu metabolismo celular<sup>12</sup>.

A variação da citraturia sob a influência da dieta parece depender mais de pequenas alterações ácido-básicas do que propriamente de seu conteúdo em citrato. A dieta rica em proteínas, do mesmo modo que os exercícios físicos extenuantes causam uma redução da citraturia por aumentarem a excreção ácida. Por outro lado a ingestão elevada de sódio leva a hipocitraturia pois diminui os níveis de aldosterona sérica. Desta forma há uma diminuição na síntese de citrato pela célula renal devido à diminuição na atividade de citrato sintetase e aumento na reabsorção tubular de citrato. A hipocitraturia também pode ser idiopática, quando nenhuma das causas citadas for identificada<sup>7,12</sup>.

A excreção de citrato pela urina pode sofrer influência do sexo, da idade e de vários hormônios. Os estró-

genos estimulam a excreção urinária de citrato ao passo que a progesterona apresenta um efeito hipocitraturico. A vitamina D, calcitonina, hormônio paratireoideiano e hormônio de crescimento também influenciam na excreção de citrato pela urina<sup>2,7,12</sup>.

Neste trabalho realizamos a medida do citrato urinário em 98 homens com idade média de 36 anos e 124 mulheres também com idade média de 36 anos, todos com cálculo renal. Verificamos que a concentração média de citrato urinário foi significativamente diferente em relação ao sexo onde as mulheres excretaram mais citrato (527 + 225 mg/24 h) do que os homens (409 + 210 mg/24 h) (p=0,0001). A hipocitraturia foi detectada em 41% dos indivíduos do sexo masculino e 18% do sexo feminino (Figura 1). Quando os 2 grupos (sexo masculino e feminino) foram separados de acordo com a idade observamos que houve diferença significativa na excreção urinária de citrato entre os sexos nas categorias 0, 1 e 2, ou seja, até os 40 anos, as mulheres excretaram mais citrato do que os homens (Tabelas I e II, Figura 2). Como pode ser visto na Figura 3, até os 40 anos, a porcentagem de pacientes com hipocitraturia foi bem maior nos homens do que nas mulheres. Após esta idade, a diferença começou a desaparecer porque nos homens houve um aumento na excreção enquanto nas mulheres a concentração de citrato diminuiu (Tabela I).

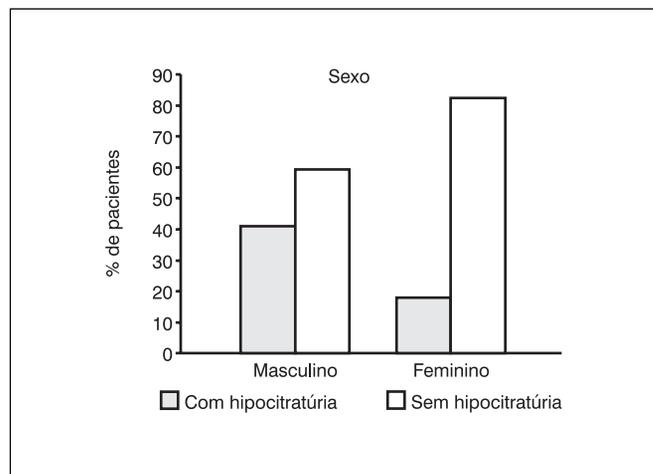


FIG. 1 - Porcentagem de pacientes segundo o sexo e a presença de hipocitraturia.

TABELA I  
Média e desvios-padrão de citrato (mg/24h)  
segundo o sexo e categoria de idade

(0 = até 20 anos; 1 = 21 a 30 anos; 2 = 31 a 40 anos; 3 = 41 a 50 anos; 4 = > 50 anos)

Sexo	Categoria de idade	n	Média	Desvio-padrão
Mulheres	0	15	449,2667	207,2719
	1	26	520,0769	225,1799
	2	39	564,4872	215,5965
	3	29	557,3793	252,6046
	4	15	460,6667	205,0504
Homens	0	11	251,6364	68,7652
	1	23	404,5217	200,4683
	2	31	381,3871	173,8228
	3	18	528,7222	264,8244
	4	15	446,7333	218,6682

**TABELA II**  
Hipóteses nula e p-valor nas categorias de idade para citrato pelo teste de Kruskal-Wallis

(0 = até 20 anos; 1 = 21 a 30 anos; 2 = 31 a 40 anos; 3 = 41 a 50 anos; 4 = > 50 anos)

Hipótese	Categoria de idade	p-valor
$\mu_{cm0} = \mu_{cf0}$	0	0,0274*
$\mu_{cm1} = \mu_{cf1}$	1	0,0242*
$\mu_{cm2} = \mu_{cf2}$	2	0,0009*
$\mu_{cm3} = \mu_{cf3}$	3	0,6537
$\mu_{cm4} = \mu_{cf4}$	4	0,9669

\*significativo ao nível de 5%;  $\mu_{cm}$ : citrato masculino;  $\mu_{cf}$ : citrato feminino

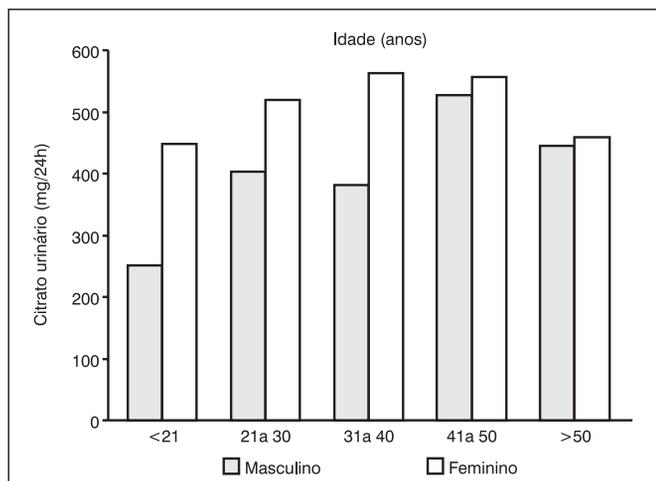


FIG. 2 - Excreção média de citrato na urina (mg/24 horas) segundo a idade e o sexo.

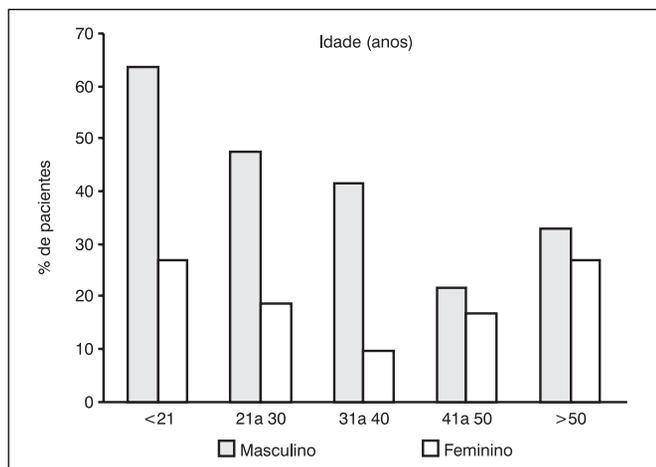


FIG. 3 - Porcentagem de pacientes com hipocitratúria segundo a idade e o sexo.

**TABELA III**  
Hipóteses e p-valor nas categorias de idade para citrato pelo teste de Wilcoxon no sexo masculino

(0 = até 20 anos; 1 = 21 a 30 anos; 2 = 31 a 40 anos; 3 = 41 a 50 anos; 4 = > 50 anos)

Hipótese	p-valor
$\mu_{cm0} = \mu_{cm1}$	0.0136*
$\mu_{cm0} = \mu_{cm2}$	0.0221*
$\mu_{cm0} = \mu_{cm3}$	0.0035*
$\mu_{cm0} = \mu_{cm4}$	0.0137*
$\mu_{cm1} = \mu_{cm2}$	0.8956
$\mu_{cm1} = \mu_{cm3}$	0.1120
$\mu_{cm1} = \mu_{cm4}$	0.4287
$\mu_{cm2} = \mu_{cm3}$	0.0500**
$\mu_{cm2} = \mu_{cm4}$	0.2863
$\mu_{cm3} = \mu_{cm4}$	0.4264

\*significativo ao nível de 5%; \*\*significativo ao nível de 10%

Em relação a idade verificamos que no sexo feminino, a excreção de citrato pela urina não foi estatisticamente diferente ( $p=0,42$ ) nas categorias estudadas. Já nos homens, detectou-se que existe diferença na concentração de citrato em relação à idade. Ao nível de 5% de significância, homens até 20 anos apresentaram valores de citrato significativamente menores em relação às outras categorias de idade (Tabela III) e, ao nível de 10%, houve diferença na concentração de citrato nas categorias 2 e 3 ( $p=0,05$ ) demonstrando que homens com idade entre 41 a 50 anos excretaram mais citrato do que aqueles com idade entre 31 e 40 anos.

Analisamos também se nas mulheres, a excreção de citrato foi diferente naquelas com idade entre 18 e 45 anos e acima de 45 anos e nossos resultados não revelaram existir diferença significativa ( $p=0,4420$ ) entre as 2 faixas etárias.

A partir destes resultados podemos concluir que o sexo influenciou na excreção urinária de citrato. A citratúria foi mais elevada nas mulheres do que nos homens até os 40 anos. Nossos dados foram semelhantes aos de Schwille *et al.*<sup>14</sup>. Eles verificaram que, de 20 a 30 anos, a mulher excreta mais citrato do que o homem, mas após os 40 anos, a diferença começa a desaparecer porque o homem aumenta enquanto a mulher mantém estável a citratúria.

Quanto à idade, concluímos que nos homens este fator influenciou na citratúria em algumas categorias de idade, o mesmo não acontecendo nas mulheres. Cunha<sup>6</sup> não encontrou diferença significativa na citratúria de indivíduos do mesmo sexo quando separados em idade menor e maior do que 45 anos.

Parece que os estrógenos são os principais responsáveis pela maior excreção de citrato pela urina e isto pode contribuir para a menor prevalência de litíase no sexo feminino<sup>12</sup>.

## REFERÊNCIAS

- Amberg, S.; McClure, B. The occurrence of citric acid in urine. *Am. J. Physiol.* 44(4):453-462, 1917.
- Barceló, P. *Metabolismo de los citratos Y su empleo terapéutico.* [on line]. Disponível na Internet: <http://www.compendium.com.ar/cin2000/com...lo/barcelo.html>
- Boothby, W. M.; Adams, M. Ocurrência de citric acid in urine and body fluids. *Am. J. Physiol.* 107:471-479, 1934.
- Campos, H. *Estatística experimental não paramétrica.* Piracicaba, ESALQ, 4ª ed., 1983.
- Costello, L. C. & O'Neil, J. J. A simplified and sensitive method for citrate determination in biological samples. *J. Appl. Physiol.* 27:120-122, 1969.
- Cunha, M. A. *Normalização da citratúria e sua relação com outros elementos urinários em indivíduos normais e litíasicos.* Tese de Mestrado apresentada à Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1993.
- Cunha, M. A.; Heilberg, I. P.; Schor, N. Citrato. In Schor, N.; Heilberg, I. P. *Calculose renal. Fisiopatologia, diagnóstico, tratamento.* São Paulo, Sarvier. p. 26-28, 1995.
- Hamm, L. L. Renal handling of citrate. *Kidney Int.* 38:728-735, 1990.
- Moellering, H.; Gruber, W. Determination of citrate with citrate-lyase. *Anal. Biochem.* 17:369-376, 1966.
- Nielsen, T. T. A method for enzymatic determination of citrate in serum and urine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36:513-519, 1976.
- Ostberg, O. Studien über die zitronensäureausscheidung der menschenniere in normalen und pathologischen zuständen. *Skand. Arch. Physiol.* 62:81-222, 1931.
- Rebello, M. A. P. Hipocitratúria. In Schor, N.; Heilberg, I. P. *Calculose renal. Fisiopatologia, diagnóstico, tratamento.* São Paulo, Sarvier. p.105-113, 1995.
- Rebello, M. A. P.; Schor, N. Dosagem enzimática do citrato urinário. *J. Bras. Nefrol.* 12(2):71-76, 1990.
- Schwille, P. O.; Scholz, D.; Schwille, K.; Leutschardt, W.; Sigel, A. Citrate in urine and serum and associated variables in subgroups of urolithiasis. *Nephron.* 31:194-202, 1982.
- Siegel, S. *Estatística não paramétrica.* São Paulo, McGraw-Hill, 1975.

Endereço para correspondência

Marlene Leiko Doi Sakuno

Av. XV de novembro 89, apto 701 - 87013-230 - Maringá, PR

E-mail: mldsakuno@uem.br

# Espécies de *Trichosporon* Behrend: colonização anal e pedra branca gênito-púbica em pacientes HIV<sup>+</sup>

## Species of *Trichosporon* Behrend: anal colonization and genito-pubic white piedra in HIV<sup>+</sup> patients

Zélia Braz Vieira da Silva Pontes; Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>1</sup>; Adriano Lira Ramos<sup>2</sup>;  
Joana D'Arc Morais da Silveira Frade<sup>3</sup> & Neuza Maria Cavalcante de Oliveira<sup>4</sup>

**RESUMO** – Espécies de *Trichosporon* foram isoladas em 9 (7,2%) dos 125 pacientes HIV<sup>+</sup>. Colonização anal foi observada em 5 (4%) destes pacientes. *T. inkin* foi isolado da região anal de dois homens bissexuais e de um homossexual e *T. asahii* de um homem bissexual e de uma mulher heterossexual. Piedra gênito púbica foi observada em 5 (5,6%) dos 90 homens. *T. inkin* foi agente de 4 (7,5%) casos de pedra branca no grupo de 53 homens homo/bissexuais e *T. asahii* foi responsável por um (2,7%) caso em heterossexual. A identificação em nível de espécie foi essencial para a diferenciação das espécies: *T. inkin* e *T. asahii* que colonizaram a região anal e foram agentes de pedra branca gênito púbica em pacientes HIV<sup>+</sup>.

**PALAVRAS-CHAVE** – Colonização; pedra branca; *Trichosporon inkin*; *Trichosporon asahii*; HIV<sup>+</sup>.

**SUMMARY** – *Trichosporon* species were isolated in about 9 (7.2%) of 125 HIV<sup>+</sup> patients. Anal colonization was observed in 5 (4%) of these patients. *T. inkin* was isolated from the anal region of two bisexual men and of a homosexual whereas *T. asahii* from a bisexual man and a heterosexual woman. Genito-pubic white piedra was observed in 5 (5.6%) of 90 men. *T. inkin* was the agent of 4 (7.5%) cases of white piedra in a group of 53 homo/bissexuals and *T. asahii* was responsible for just one (2.7%) case in a heterosexual. The identification at the level of species was essential for the differentiation of the species *T. inkin* and *T. asahii* which colonized the anal region and were the agents of genito-pubic white piedra in HIV<sup>+</sup> patients.

**KEYWORDS** – Colonization; white piedra; *Trichosporon inkin*; *Trichosporon asahii*; HIV<sup>+</sup>.

### INTRODUÇÃO

**A** *Trichosporon* Behrend é um gênero de leveduras com afinidade Basidiomycetes. *T. beigeli*, ou sinônimo *T. cutaneum*, era considerado o único agente de infecções cutâneas (Snock, 1979; Kamalam *et al.*, 1981; García-Matos & Mira Gutiérrez, 1995), onicomioses (Fusaro *et al.*, 1984), otomicose (Reiersøl *et al.*, 1955), pedra branca (Zaror *et al.*, 1989; Juang *et al.*, 2000) e infecção sistêmica (Waltson & Kallichurum, 1970; Haupt *et al.*, 1983) e as infecções foram excepcionalmente relatadas em pacientes HIV<sup>+</sup> (Leaf *et al.*, 1989; Lascaux *et al.*, 1998). Piedra branca é uma infecção caracterizada por nódulos brancos a marrons claros, de consistência média, constituídos de artro e blastoconídios que podem circundar a haste inteira dos pêlos. A incidência de pedra branca genital tem sido reportada em pacientes assintomáticos procedentes de clínica gênito-urinária com percentuais que variaram de 4% em homens bi/homossexuais no Reino Unido (Walzman *et al.*, 1989), 25% em homossexuais na Dinamarca (Stenderup *et al.*, 1986) e 25,6% em homens estudantes brasileiros (Fischman *et al.*, 1980). A colonização na região anal em homens homossexuais foi relatado na Suécia, Dinamarca e Reino Unido (Torsander *et al.*, 1985; Stenderup *et al.*, 1986; Walzman &

Leeming, 1989). Guého *et al.* (1992), basearam-se em caracteres biomoleculares e descreveram seis espécies patogênicas ao homem e a denominação *T. beigeli* foi considerada duvidosa. Thérizol-Ferley *et al.* (1994), relataram *T. asahii*, *T. mucoides* e *T. inkin* como responsáveis por casos de pedra branca gênito-púbica e intertrigo em mulheres, no Gabon, África.

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência de colonização anal e pedra branca gênito-púbica por espécies de *Trichosporon* em pacientes HIV<sup>+</sup> homo, bi e heterossexuais.

### MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo os pacientes HIV<sup>+</sup>, após consentimento por escrito, foram atendidos no Complexo Hospitalar de Doenças Infecto-contagiosas Clementino Fraga, na cidade de João Pessoa-PB. Eles foram interrogados sobre práticas sexuais e o teste de anticorpos HIV 1 foi realizado por ELISA, confirmado por Western-blot com quantificação de linfócitos T. Os pacientes foram considerados sintomáticos quando o número de linfócitos CD4<sup>+</sup> foram = 350 células/mm<sup>3</sup> e apresentaram associação com outras infecções (Brasil, 2000). Trinta deles eram homens homossexuais, 23 bissexuais e 37 heterossexuais. Trinta e cinco mulheres

Recebido em 7/5/2002

Aprovado em 8/7/2002

<sup>1</sup>Professoras de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB; <sup>2</sup>Acadêmico, Habilitação Análises Clínicas, UFPB;

<sup>3</sup>Médica Infectologista, Complexo Hospitalar de Doenças Infecto Contagiosas Clementino Fraga, João Pessoa-PB;

<sup>4</sup>Farmacêutica Bioquímica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB.

HIV<sup>+</sup> também participaram do estudo. As idades dos pacientes variaram entre 15-74 anos (média de 34,39 anos). Todos eles eram nativos da Região Nordeste e, na sua grande maioria, do Estado da Paraíba.

As amostras de pêlos genitais foram coletados, após exame clínico, com auxílio de tesoura e as da região anal, por zaragatoas estéreis.

O estudo micológico incluiu exame microscópico direto dos pêlos com hidróxido de potássio/tinta preta (Parker) (Cohen, 1954). As culturas dos pêlos e amostras anais foram realizadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) com cloranfenicol (200 µg/ml) e incubadas à temperatura ambiente (28-30°C) por 4 semanas. As espécies fúngicas foram identificadas de acordo com os critérios de Guého *et al.* (1992)

## RESULTADOS

Espécies de *Trichosporon* foram observadas em 7,2% (9/125) dos pacientes examinados. Todas as cepas produziram urease, cresceram a 37 e 42°C. As propriedades assimilativas foram observadas frente à várias fontes de carbono (eritritol, galactitol, glucano- $\delta$ -lactone, L-arabinitol, D-glucosamina, L-sorbose, inositol, melizitose, melibiose, D-galactose, ramose) e nitrogênio (creatinina, nitrato de potássio e peptona), assim como sensibilidade a cicloheximida (0,1 e 0,01%).

O exame microscópico direto dos pêlos revelou nódulos constituídos de artro e blastoconídios em 3 dos 5 casos. *T. inkin*, foi caracterizado por colônia bege, cerebriforme, farinhosa, com pequena zona marginal e com o seu envelhecimento foram observadas rachaduras no meio ágar Sabouraud dextrose. No microcultivo, em ágar malte a 2% foi observada produção de hifas, artroconídios, pseudomicélios com blastoconídios e apressorias. Em ágar glicose a 50% foi observado desenvolvimento sarcínico. Macroscopicamente, *T. asahii*, apresentou colônia pustular, zona marginal larga e fissurada, cor bege que, com envelhecimento, adquiriu cor ligeiramente amarronzada. A micromorfologia foi caracterizada por hifas em paralelo, disarticulando em artroconídios retangulares e em forma de barril.

A Tabela I mostra as espécies de *Trichosporon* que colonizaram a região anal e agentes de pedra branca gênito-púbica em pacientes HIV<sup>+</sup>. Colonização na região anal foi observada em 5 (4%) dos 125 pacientes. *T. inkin* foi isolado de dois homens bissexuais e um homossexual e *T. asahii* foi isolado de cultura anal de um homem bissexual e de uma mulher heterossexual. Nenhuma espécie de *Trichosporon* foi isolada colonizando os homens heterossexuais.

Piedra branca gênito-púbica apresentou uma frequência de 5,6% entre os 90 homens. *T. inkin* foi agente de 4 (7,5%) dos casos de pedra branca no grupo de 53 homens homo/bissexuais e *T. asahii* foi responsável

por um (2,7%) caso em heterossexual. Não foi observado nenhum caso nas mulheres. Um paciente bissexual apresentou colonização anal e piedra branca gênito-púbica por *T. inkin*.

Tricobacteriose foi observada em 21,6% dos 125 pacientes e associação entre bactéria e espécies de *Trichosporon* infectando os pêlos genitais foi observada em três dos cinco casos.

## DISCUSSÃO

Poucos são os estudos sobre leveduras do gênero *Trichosporon* colonizando pele normal humana (Mok & Barreto, 1984; Ellner *et al.*, 1991). Na literatura, há registros de colonização em populações selecionadas de homo e/ou bissexuais (Torssander *et al.*, 1985; Stenderup *et al.*, 1986; Walzman *et al.*, 1989). No nosso estudo, a colonização da região anal por espécies de *Trichosporon*, em homens HIV<sup>+</sup> homo/bissexuais apresentou uma frequência de 7,5% (4/53) e de 2,7% (1/37) nas mulheres. Walzman & Leeming (1989), relataram uma frequência de 4% no grupo de homens homo/bissexuais. Entretanto, estes relatos não corroboraram com os achados de 15,5% em homens HIV<sup>+</sup>, homossexuais contra 2,5% em heterossexuais na Suécia (Torssander *et al.*, 1985) e de 13% em homens homossexuais na Dinamarca (Stenderup *et al.*, 1986).

O modo de infecção no homem não é claro e seus agentes têm sido isolados de solos, água, animais em decomposição e matéria vegetal (Kaplan, 1959; Guého *et al.*, 1992; Sugita *et al.*, 2000). Torssander *et al.* (1985) sugerem uma possível transmissão sexual e o risco de desenvolvimento de uma infecção sistêmica por *Trichosporon* em homens homossexuais infectados pelo vírus HIV 1. O fato de espécies de *Trichosporon* terem sido isoladas em maior frequência da região anal do grupo de pacientes homens homo/bissexuais indicaria transmissão sexual da levedura por contato retal, mas isto também não foi claro. Os nossos pacientes eram na sua grande maioria sintomáticos (80%) e a colonização por espécies de *Trichosporon* poderia implicar em um risco de desenvolvimento de uma infecção sistêmica. Haupt *et al.* (1983) sugerem que cultura de vigilância positiva para espécies de *Trichosporon* poderia está correlacionada com infecção sistêmica em pacientes imunocomprometidos e que repetida cultura de urina positiva indicaria disseminação. Raros são os casos de infecção sistêmica por espécies de *Trichosporon* em pacientes HIV<sup>+</sup> sintomáticos, onde o déficit imunitário em células T está em primeiro plano (Leaf & Smiberkoff, 1989; Lascaux *et al.*, 1998; Parsonnet, 1989; Barchiesi *et al.*, 1993; Coppola *et al.*, 1993; Nahass *et al.*, 1993).

Relatos de pedra branca nas regiões gênito-púbicas tem aumentado, tendo sido observados em pacientes de ambos os sexos. É uma infecção comum nas Américas (Carneiro *et al.*, 1971; Benson *et al.*, 1983; Kalter *et al.*, 1986), destacando-se o Brasil (Fischman *et al.*, 1980; Zaror *et al.*, 1989, Almeida *et al.*, 1990), tendo sido também diagnosticada na África (Thérizol-Ferley *et al.*, 1994), Ásia (Palungwachira *et al.*, 1991) e Europa (Torssander *et al.*, 1985; Stenderup *et al.*, 1986; Avram *et al.*, 1987; Walzman & Leeming, 1989), mas diferenças regionais foram observadas. Em nosso estudo, todos os casos de pedra branca gênito-púbica foram observados em homens com idade inferior a 34 anos. A maioria dos casos relatados na literatura tiveram como agente *T. beigeli*, sinônimo *T. cutaneum*

TABELA I

Espécies de *Trichosporon* Behrend colonizando a região anal e agentes de pedra branca gênito-púbica em pacientes HIV<sup>+</sup>

Categoria	Espécies			
	<i>Trichosporon inkin</i>		<i>Trichosporon asahii</i>	
	Pele	Pêlo	Pele	Pêlo
Heterossexuais	-	-	1	1
Homossexuais	1	2	-	-
Bissexuais	2	2	1	-

\*Um paciente bissexual apresentou colonização anal e piedra branca gênito-púbica por *T. inkin*.

(Benson *et al.*, 1983; Avram *et al.*, 1987; Almeida *et al.*, 1990; Torssander *et al.*, 1985; Stenderup *et al.*, 1986; Walzman & Leeming, 1989) que com a revisão taxonômica do gênero *Trichosporon*, baseada em caracteres morfológicos, bioquímicos, nicho ecológico e biologia molecular, seis espécies patogênicas ao homem foram descritas: *T. mucoides*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. ovooides*, *T. inkin* e *T. cutaneum*. A denominação *T. beigeli* não foi preservada (Guého *et al.*, 1992). Entretanto, esta denominação continua sendo usada na literatura, trazendo confusão e não permitindo o conhecimento das espécies de *Trichosporon* implicadas em processos patológicos (Shadi & Chadeganipour, 1996; Kai-Man, *et al.*, 1997; Juang *et al.*, 2000; Man-Heui *et al.*, 2000). Em nossos pacientes, duas espécies foram isoladas colonizando a região anal e causando piedra branca gênito-púbica: *T. inkin*, espécie mais freqüente e relacionada também na literatura como responsável por casos de piedra branca gênito-púbica, intertrigo, infecção urinária, endocardite e isolado da região anal de pacientes (Guého *et al.*, 1994, Thérizol-Ferly *et al.*, 1994; Blancard *et al.*, 1995; Chaumontin *et al.*, 1996). *T. asahii* apresentou uma menor freqüência. Entretanto, nos 52 casos de piedra gênito-púbica e associações clínicas, em mulheres no Gabon, África, *T. asahii* representou 13,5% dos isolados (Thérizol-Ferly *et al.*, 1994). Está espécie foi também isolada de sangue humano e lesões de pele (Guého *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1996). Piedra branca genital pode ser indistinguível de tricobacteriose (Rippon, 1974). Intertrigo freqüentemente coexistem com piedra branca gênito-púbica e os pêlos, sejam gênito-púbicos ou do couro cabeludo (Thérizol-Ferly *et al.*, 1994), podem ser afetados simultaneamente por bactéria (Figueras & Guarro, 2000). Em nosso estudo, esta associação foi observada em 3 dos 5 casos de piedra branca gênito-púbica.

Concluindo, observamos que *T. inkin* e *T. asahii* colonizaram a região anal e foram agentes de piedra branca gênito-púbica em pacientes HIV<sup>+</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Aos médicos e funcionários do Complexo de Doenças Infecto Contagiosas Clementino Fraga e aos funcionários do Núcleo DST/AIDS, todos lotados na Secretária de Saúde do Estado da Paraíba.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, H. L.; Rivitti, E. A.; Jaeger, R. G. White piedra: ultrastructure and a new micro-ecological aspect. *Mycoses*. 33:491-497, 1990.
- Avram, A.; Buot, G.; Binet, A.; Garcia, A. M.; Cesarini, J. P. Étude clinique et mycologique concernant 11 cas de trichosporie noueuse (piedra blanche) génito-pubienne. *Ann. Dermatol. Venereol.* 114:819-827, 1987.
- Barchiesi, F.; Morbiducci, V.; Ancarani, F.; Arzeni, D.; Scalise, G. *Trichosporon beigeli* fungemia in an AIDS patient. *AIDS*. 7:139-40, 1993.
- Benson, P. M.; Lapins, N. A.; Odom, R. B. White piedra. *Arch. Dermatol.* 119:602-604, 1983.
- Blancard, A.; Gouin, F.; Dunan, S.; Quilici, M. Infection urinaire à *Trichosporon inkin*. *Méd. Mal. Infect.* 25:605-606, 1995.
- Brasil, Ministério da Saúde, Coordenação Nacional DST/AIDS. *Recomendação para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV*. Brasília, DF: 2000.
- Carneiro, J. A.; Assis, F. A.; Filho, J. T. Piedra branca genital: 40 casos. *An. Bras. Dermatol.* 46:265-269, 1971.
- Chaumontin, G.; Boibieux, A.; Piens, M. A.; Douchet, C.; Buttard, P.; Bertrand, J. L.; Peyramond, D. *Trichosporon inkin* endocarditis: short-term evolution and clinical report. *Clin. J. Dis.* 23:396-397, 1996.
- Cohen, M. N. A. Simple procedure for staining tinea versicolor (*M. furfur* with fountain pen ink). *J. Invest. Derm.* 22: 9-10, 1954.
- Coppola, S.; Angarano, G.; Montagna, M. T.; Congedo, P.; Bellisario, A.; Monno, L.; Infante, G.; Pastore, G. *Trichosporon beigeli* infection in AIDS patients undergoing antifungal prophylaxis. *J. Mycol. Méd.* 3:169-171, 1993.
- Ellner, K.; McBride, M. E.; Rosen, T.; Berman, D. Prevalence of *Trichosporon beigeli*. Colonization of normal perigenital skin. *J. Med. Vet. Mycol.* 29, 2:99-103, 1991.
- Figueras, M. J.; Guarro, J. Ultrastructural aspect of the keratinolytic activity of piedra. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:136-141, 2000.
- Fischman, O.; Pires de Camargo, Z.; Meirele, M. C. A. Genital white piedra: an emerging fungal disease? 5<sup>th</sup> International Conference on Mycoses. *PAHO Sci. Publ.* 396:70-76, 1980.
- Fusaro, R. M.; Miller, N. G. Onychomycosis and *Trichosporon beigeli* in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11:747-749, 1984.
- García-Matos, P.; Mira-Gutiérrez. *Trichosporon* y tricosporonosis: a propósito de 13 casos. *Rev. Iberoam. Micol.* 12:111-113, 1995.
- Guého, E.; Improvisi, L.; de Hoog, G. S.; Dupont, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*. 37:3-10, 1994.
- Guého, E.; Smith, M. T.; de Hoog, G. S.; Billon-Grand, G.; Christen, R.; Batenburg-van der Vegte, W. H. *Contributions to a revision of the genus Trichosporon*. Antonie van Leeuwenhoek. 61:289-316, 1992.
- Haupt, H. M.; Merz, W. G.; Beschoner W. E.; Vaughan, W. P.; Saral, R. Colonization and infection with *Trichosporon* species in the immunosuppressed host. *J. Inf. Dis.* 147, 2:199-203, 1983.
- Itoh, T.; Hosokawa, H.; Kohdera, U.; Toyazaki, N.; Asada, Y. Disseminated infection with *Trichosporon asahii*. *Mycoses*. 39, 5-6: 195-199, 1996.
- Juang, J. M.; Marques, E. R. M. C.; Couto, L. W. M.; Metelmann, U.; Silva, E. H. Piedra branca no couro cabeludo. *An. Bras. Dermatol.* 75 (Suppl 2):25, 2000.
- Kai-Man, K.; Wai-Fan, A.; Pui-Yu, W.; May-May, C. Onychomycosis in Hon Kong. *J. Int. Dermatol.* 36, 10:756-761, 1997.
- Kalter, D. C.; Tschén, J. A.; Cernoch, P. L.; McBride, M. E.; Sperber, J.; Bruce, S.; Wolf, J. E. Genital white piedra: epidemiology, microbiology, and therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 14:982-993, 1986.
- Kamalam, A.; Thambiah, A. S. Prevalence of dermatomycoses in Madras city. *Indian. J. Med. Res.* 73, 513-518, 1981.
- Kaplan, W. Piedra in lower animals. A case report of white piedra in a monkey and a review of the literature. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 134, 113-117, 1959.
- Lascaux, A. S.; Bouscarat, F.; Descamps, V.; Casalino, E.; Picard-Dahan C.; Crickx, B.; Belaich, S. Manifestations cutanées au cours d'une trichosporonose disséminée chez un malade sidéen. *Ann. Dermatol. Venerol.* 125, 2:111-113, 1998.
- Leaf, H. L.; Simberkaff, M. S. Invasive trichosporonosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Inf. Dis.* 160, 356-357, 1989.
- Man-Heui, H.; Jee-Ho, C.; Kyung-Jeh, S.; Kee-Chan, M.; Jai-Kyoung, K. Onychomycosis and *Trichosporon beigeli* in Korea. *Int. J. Dermatol.* 39, 4:266-269, 2000.
- Mok, W. Y.; Silva, M. S. B. Mycoflora of the human dermal surfaces. *Canadian J. Microbiol.* 30, 10:1205-1209, 1984.
- Nahass, G. T.; Rosenberg, S. P.; Leonardi, C. L.; Penneys, N. S. Disseminated infection with *Trichosporon beigeli*. Report of a case and review of the cutaneous and histologic manifestations. *Arch. Dermatol.* 129:1020-1023, 1993.
- Palungwachira, P.; Chongsathien, S.; Palungwachira, P. White piedra. *Australas J. Dermatol.* 32:75-79, 1991.
- Parsonnet, J. *Trichosporon beigeli* peritonitis. *South Med. J.* 82:1062-1063, 1989.
- Reiersöl, S. *Trichosporon cutaneum* isolated from a case of otomycosis. *Acta. Pathol. Microbiol. Scandinavia.* 37, 459-463, 1955.
- Rippon, J. W. Piedra. In: *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia: Saunders Co., 1974, 91-95p.
- Shadi, S.; Chadeganipour, M. Isolation of opportunistic fungi from bronchoalveolar lavage of compromised hosts in Isfahan, Iran. *Mycopathol.* 133, 2:79-83, 1996.
- Sonck, C. E. On the incidence of yeast species from human sources in Finland. III. Yeast flora of some skin regions (except feet and nails). *Mykosen.* 22, 4:129-139, 1979.
- Stenderup, A.; Schonheyder, H.; Ebbesen, P.; Melbye, M. White piedra and *Trichosporon beigeli* carriage in homosexual men. *J. Med. Veter. Mycol.* 24:401-406, 1986.
- Sugita, T.; Nishikawa, A.; Ichikawa, T.; Ikeda, R.; Shinoda, T. Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. *Med. Mycol.* 38, 1:27-30, 2000.
- Thérizol-Ferly, M.; Kombila, M.; Gomez de Diaz, M.; Douchet, C.; Salaun, Y.; Barrabes, A.; Duong, T. H.; Richard-Lenoble, D. White piedra and *Trichosporon* species in equatorial Africa II. Clinical and mycological associations: a analysis of 449 superficial inguinal specimens. *Mycoses*. 37:255-260, 1994.
- Torssander, J.; Carlsson, B.; von Krogh, G. *Trichosporon beigeli*: increased occurrence in homosexual men. *Mykosen.* 28, 7:355-356, 1985.
- Walzman, M.; Leeming, J. G. White piedra and *Trichosporon beigeli*: the incidence in patients attending a clinic in genitourinary medicine. *Genit. Med.* 65:331-334, 1989.
- Watson, K. C.; Kallichurum, S. Brain abscess due to *Trichosporon beigeli*. *J. Med. Microbiol.* 3, 191-193, 1970.
- Zaror, L.; Fischman, O.; Petri, V.; Carvalho, M. T. F.; Pope, S.; Porfirio, N. Piedra blanca genital. Reporte de tres casos. *Bol. Micol.* 4, 3:125-127, 1989.

Endereço para correspondência:

Zélia Braz Vieira da Silva Pontes  
Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Micologia  
Cidade Universitária, Castelo Branco III, 58.038.910 - João Pessoa-PB - Brasil  
Fax (0xx83)216-7490 - E-mail: pesqccs@ccs.ufpb.br